

Aus der Medizinischen Klinik der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. med. J. van de Loo)

ZUR PRÄPARATION UND FÄRBUNG MENSCHLICHER
KNOCHENMARKZELLEN FÜR DIE IMPULSCYTOPHOTO-
METRIE - EINE METHODISCHE STUDIE

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fachbereiche

5 Vorklinische und Theoretische Medizin

6 Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von

Ulrich Fahrenkroog

aus Hamburg

1980



Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Universität Münster

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. Themann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Th. Büchner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Göhde

Tag der Promotion: 12. Februar 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552206_0029

Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgelegten methodischen Studie war, eine ökonomische, der klinischen Routine und vor allem eine der hohen Leistungsfähigkeit des Impulscytophotometers gerechte Präparationsmethode zu entwickeln. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Es wurde die von BÜCHNER et al. (16) und von R.M. HIDDEMANN (33) beschriebene Präparationsmethode von Knochenmark und Blut als Basismethode wie auch als Vergleichsmaßstab gewählt und versucht, durch Verbesserung der einzelnen Präparationsschritte dem o.g. Ziel näherzukommen. Variiert wurden zum einen die Hämolysen-, zum anderen die Färbetechnik. Als Versuchsmaterial wurde einmal menschliches Blut, sonst durchweg menschliches Knochenmark verwendet.

Die modifizierte Präparationsmethode wurde anhand der mittels ICP gewonnenen DNS-Histogramme auf Qualität der Zellanfärbung, Ausmaß der Zellverklebungen und Entstehung von Zellfragmenten geprüft.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen können folgende Aussagen gemacht werden:

DNS-Histogramme von Blut nach Hämolysen mit hypotoner, d.h. 0,1%-iger Kochsalzlösung lassen gegenüber Histogrammen von Knochenmark nach Hämolysen mit Leitungswasser eine schlechtere Anfärbbarkeit der Zellen erkennen.

Gleichzeitige Hämolysen und Färbung von Knochenmark mit hypotoner Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/l 0,22% NaCl) offenbart im DNS-Histogramm in 71,4% der Fälle eine Verschlechterung der Zellanfärbung gegenüber Hämolysen mit Leitungswasser und konsekutiver Färbung mit EB (10 mg/l 0,9% NaCl) und zu 50% einen Anstieg der Zellverklebungsraten.

Durch Verlängerung der Färbezeit mit EB (10 mg/l 0,9% NaCl) bis zu 25,5 Stunden verändert sich das DNS-Histogramm von Knochenmark nicht wesentlich.

Eine nicht ausreichende Zellfärbung wird im DNS-Histogramm von Knochenmark deutlich bei Verwendung von Tris-Puffer anstatt von Kochsalz als Grundlösung für EB.

Färbung des Knochenmarks mit Mithramycin (MM) ergibt im DNS-Histogramm einerseits eine geringe Verschlechterung in Bezug auf die Anfärbbarkeit der Zellen, andererseits eine Zunahme der Fluoreszenzsignale um 37,5% bis 50%. Die Anzahl der Zellverklebungen bleibt konstant.

Die Fluoreszenz nach Färbung mit einer Mischung von EB und MM im molaren Verhältnis 1:2 nimmt um mindestens 147% gegenüber alleiniger EB-Färbung zu. Die Qualität der Zellanfärbung ist konstant, d.h. teils verbessert, teils verschlechtert.

Nach Färbung des Knochenmarks mit EB und darauffolgender Färbung mit MM erhöhen sich die Fluoreszenzsignale um bis zu 500% gegenüber singulärer EB-Färbung. Nach Färbezeiten von weniger als einer Stunde mit EB oder MM werden im DNS-Histogramm bei der EB/MM-Färbung Zeichen der ungenügenden Zellanfärbung sichtbar. Diese verschwinden nach Mindest-Einzelfärbezeiten von einer Stunde mit EB und darauf mit MM. Die Fläche über Kanal 0-20 verringert sich um durchschnittlich 0,5%. Dadurch wird in 70,8% der Fälle eine verbesserte Anfärbbarkeit der Zellen erreicht. Die Verringerung der Zellverklebungsraten ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,07 > p > 0,06$ nicht signifikant.

Abschließend kann gesagt werden, daß mit dieser Färbemethode nach vorheriger Hämolysen des Knochenmarks durch Leitungswasser und Konservierung in 35%-igem Alkohol eine einfach zu handhabende Präparationstechnik für hämatologisches Material für die ICP zur Verfügung steht, die statistisch reproduzierbare genaue Ergebnisse nach 2 Stunden Färbezeit liefert. Damit sind die Voraussetzungen für eine klinisch relevante und direkt verwertbare Kontrolle zellkinetischer Effekte gegeben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	5
2.1. Impulscytophotometrie	5
2.2. Das DNS-Histogramm	13
2.3. Fluoreszenzfarbstoffe	17
2.3.1. Ethidiumbromid (EB)	17
2.3.2. Mithramycin (MM)	18
2.4. Bisher angewandte Präparationsmethode	19
2.5. Versuchsreihenbeschreibung	19
3. Ergebnisse	26
3.1. Vergleich zwischen Leitungswasser- Hämolyse und Hämolyse mit hypotoner NaCl-Lösung	26
3.2. Prüfung der Hämolyse von nativem Knochenmarksmaterial durch hypotone EB-Lösung	26
3.3. Effekte von EB nach unterschiedlich langen Färbezeiten	30
3.4. Gegenüberstellung von EB/NaCl und EB/Tris-Puffer	33
3.5. Vergleich zwischen EB- und MM-Färbung	33
3.6. Vergleich zwischen EB- und EB/MM-Färbung	33
3.7. Prüfung einer zeitlich abgestuften EB/MM-Färbung	39

	Seite
3.8. Statistische Überprüfung der Ergebnisse nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung im Vergleich zur bisher angewandten EB-Färbung	46
4. Diskussion	60
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	75
7. Danksagung	89
8. Lebenslauf	90

1. Einleitung

Die 1969 von DITTRICH und GÖHDE (29, 30, 31) entwickelte und 1971 von BÜCHNER (8, 11, 12, 13) in die Hämatologie eingeführte Impulscytophotometrie eignet sich im besonderen Maße zur Kontrolle zellkinetischer Effekte in der Tumorthherapie, d.h., mit dieser Methode waren erstmals die Bedingungen gegeben, cytocide Wirkungen und zellkinetische Abläufe zu erkennen und ständig zu verfolgen. Dies setzt genaue Kenntnisse des Lebenszyklus der teilungsfähigen Zellen voraus. Seit HOWARD und PELC (34) wird der Zellzyklus in Abhängigkeit vom zeitlichen Ablauf der DNS-Synthese in vier Teilphasen unterteilt (Abb. 1). Nach der Mitose folgt zunächst die meist länger dauernde G_1 -Phase, in der die Synthese zellspezifischer Proteine bzw. Enzyme stattfindet. Die sich anschließende Phase der DNS-Verdopplung wird S-Phase genannt. Darauf folgt eine relativ kurze prämitotische Ruhepause, die G_2 -Phase. In dieser Phase werden u.a. die zur Kernteilung notwendigen Spindelproteine synthetisiert. Schließlich gibt es noch ein nicht proliferierendes Compartment aus temporär ruhenden sog. G_0 -Phase-Zellen, die den gleichen DNS-Gehalt besitzen wie Zellen aus der G_1 -Phase. Es lassen sich also Zellen anhand ihres unterschiedlichen DNS-Gehaltes jeweils bestimmten Zyklusphasen zuteilen (62) (Abb. 2). Bei der o.g. Impulscytophotometrie

Abb. 1

Schematische Darstellung des Generationszyklus teilungsfähiger Zellen und der G_0 -Population ("ruhende" Zellen).

- $G_1 \hat{=}$ G_1 -Phase: Synthese zellspezifischer Proteine
 $S \hat{=}$ S -Phase: DNS-Verdoppelung
 $G_2 \hat{=}$ G_2 -Phase: u.a. Synthese der Spindelproteine
 $M \hat{=}$ Mitose-Phase: Zellteilung
 $G_0 \hat{=}$ G_0 -Population: nicht proliferierendes Compartment
aus temporär ruhenden Zellen

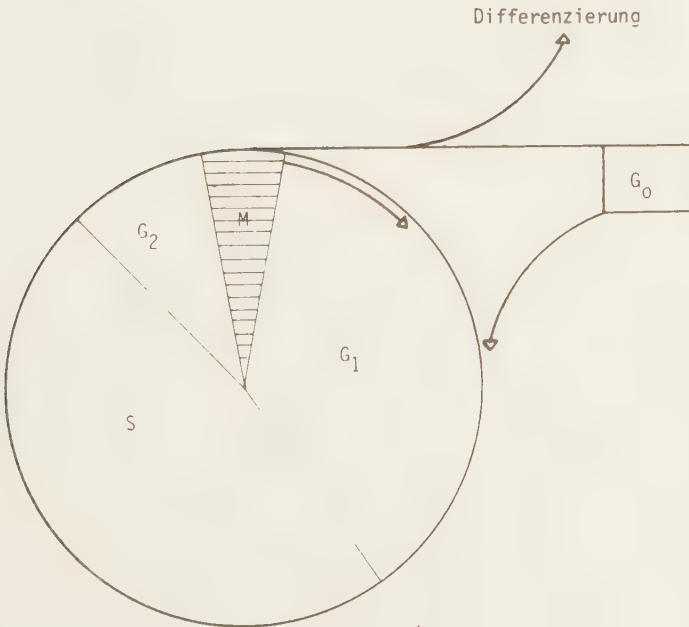


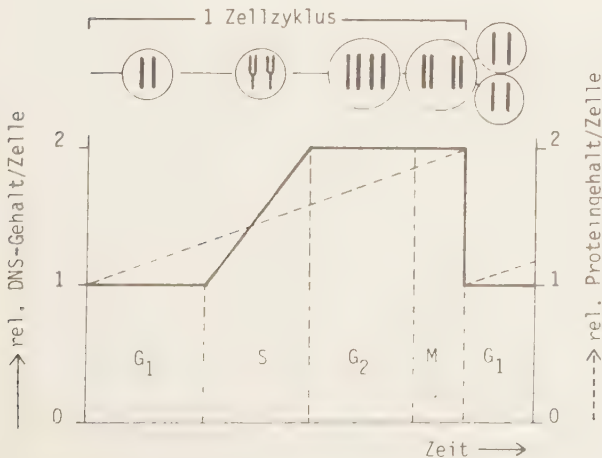
Abb. 2

Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus

(GÖHDE 1972)

Die Zunahme der DNS-Menge pro Zelle erfolgt nur während der DNS-Synthese-Phase (S-Phase), während die Proteinmenge pro Zelle kontinuierlich während des ganzen Zellzyklus zunimmt.

In sich vermehrenden Zellkollektiven finden sich stets eine Gruppe von Zellen mit einheitlich niedrigem DNS-Gehalt (G_1 -Phase-Zellen), eine Gruppe von Zellen mit einheitlich doppelt so hohem DNS-Gehalt (G_2+M -Phase-Zellen) sowie eine Gruppe von Zellen mit DNS-Konzentrationen, die zwischen dem niedrigen und hohen Wert liegen und nicht einheitlich sind (S-Phase-Zellen). Diese drei Gruppen lassen sich im DNS-Histogramm unterscheiden.



handelt es sich um ein Zelldurchflußverfahren, das mittels Fluorochromierung der intrazellulären DNS schnell verfügbare Informationen über die Verteilung von Zellen in den verschiedenen Zyklusphasen $G_1 (+ G_0)$, S, G_2 + Mitose in Form eines DNS-Histogramms liefert. Dabei zeichnet sich diese Methode sowohl durch ihre hohe statistische Genauigkeit als auch durch ihren geringen Aufwand an Zeit und Arbeit aus. Voraussetzung ist jedoch eine ökonomische, der klinischen Routine und der hohen Leistungsfähigkeit des Impulscytophotometers gerechte Präparationsmethode für hämatologisches Zellmaterial. Methodische Probleme liegen noch in der Anfärbbarkeit der Zellen, d.h., die DNS-Spezifität der Färbung kann noch gesteigert werden. Ein objektives Kriterium dafür wäre z.B. eine geringere Streubreite von G_1 -Zellen im DNS-Histogramm. Verbesserungsfähig erscheinen die bisherigen Präparationsmethoden auch im Hinblick auf Verringerung der Anzahl der Zellverklebungen und Zellfragmente.

Diese methodischen Probleme zu lösen und eine o.g. Kriterien gerechtwerdende Präparationsmethode für hämatologisches Zellmaterial für die Impulscytophotometrie zu entwickeln, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.

2. Material und Methode

2.1. Impulscytophotometrie

Bei der Cytophotometrie handelt es sich um ein Verfahren, das die Absorption oder - wie heute weitgehend bevorzugt - die Fluoreszenz einzelner gefärbter oder ungefärbter Zellinhaltsstoffe mißt und so Substanzmengen (DNS, RNS, Protein etc.) von 10^{-12} bis 10^{-13} g in einzelnen Zellen quantitativ erfassen kann.

Die Methode hat ihren Ursprung in der Einzelzellcytophotometrie und dem 1957 von CASPERSSON (18) eingeführten Scanning-Verfahren, bei dem einzelne Zellen durch zeilenweises Durchrastern ausgemessen werden. Die ersten automatisierten Durchflußverfahren wurden von MOLDOVAN 1934 (50) und CROSLAND-TAYLOR (23) entwickelt. KAMENSKY 1965 (35) und KÖNIG 1968 (44) benutzten diese Methode, um mit verbesserten Färbemethoden biologisches Material aufgrund seiner besonderen optischen Eigenschaften durch Histogramme zu beschreiben. Allen diesen früheren Versuchen, die zur Automation der Cytophotometrie unternommen wurden, ist gemeinsam, daß Durchflußverfahren zur Anwendung kamen, bei denen der Dispersionsstrom senkrecht zur optischen Achse des Beobachtungssystems durch die Meßstelle bewegt wird (Abb. 3). Der Nachteil dieser Methode ist, daß die für die genaue Erfassung der Absorptions-

Abb. 3

Schematische Darstellung einiger bislang angewandter Durchflußsysteme (die Meßebene ist jeweils gestrichelt eingezeichnet)

a) nach MOLDOVAN (1934)

Senkrechter Verlauf des Zellstroms zur optischen Achse mit großer Streuung der zu messenden Partikel im Bereich der Meßebene

b) nach CROSLAND-TAYLOR (1953)

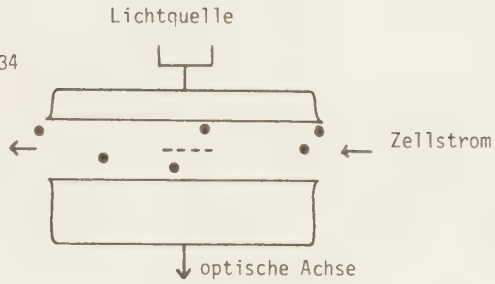
Senkrechter Verlauf des Zellstroms zur optischen Achse mit Einengung des Streubereichs durch einen parallel verlaufenden zellarmen Hüllstrom

c) nach DITTRICH und GÖHDE (1969)

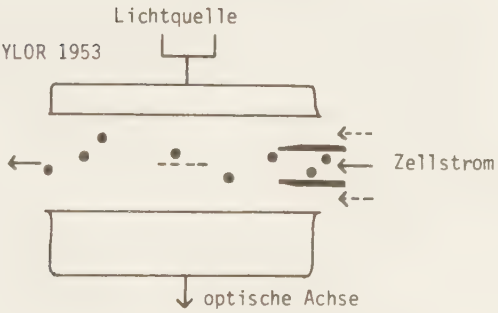
d) nach GÖHDE und DITTRICH (1971)

Zwei Modifikationen eines Durchflußsystems mit parallel zur optischen Achse verlaufendem Zellstrom. Aufgrund dieser Anordnung tritt jede Zelle durch den Schärfenbereich der Meßebene

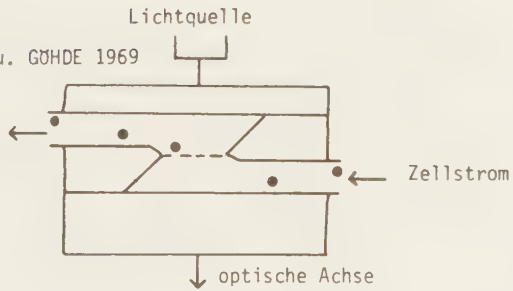
a) MOLDOVAN 1934



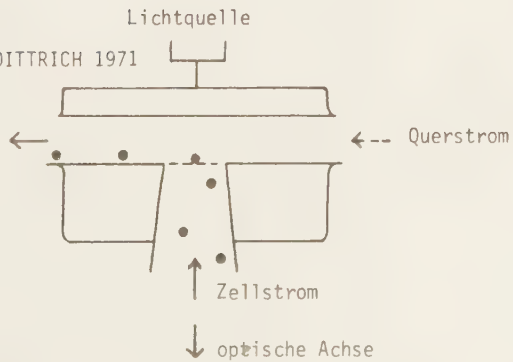
b) CROSLAND-TAYLOR 1953



c) DITTRICH u. GÖHDE 1969



d) GÖHDE u. DITTRICH 1971



oder Fluoreszenzeigenschaften erforderliche exakte Fokussierung der Zellen nicht mehr möglich ist, da die Zellen die Meßstelle in unterschiedlichen Ebenen passieren können. VAN DILLA et al. 1969 (26) konnten diese Schwierigkeiten nur zum Teil dadurch beseitigen, daß sie ein sehr langbrennweitiges Projektionsobjektiv verwendeten.

1969 gaben DITTRICH und GÖHDE (27) ein Durchflußverfahren an, das wesentliche Vorteile gegenüber den früheren Anordnungen bietet und das 1971 von GÖHDE und DITTRICH (31) weiter verbessert wurde (Abb. 3). Eine genaue Fokussierung der Zellen wird dadurch erreicht, daß die Zellsuspension in der Durchflußkammer parallel zur optischen Achse des verwendeten Mikroskops durch die Meßstelle fließt. Durch einen senkrecht zur optischen Achse verlaufenden Flüssigkeitsstrom, der keine Zellen enthält und den gleichen Brechungsindex wie der Dispersionsstrom besitzt, werden die Zellen, die mit einem DNS-spezifischen fluoreszierenden Farbstoff angefärbt worden sind, rasch von der Meßstelle fortgespült. Eine Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100 W/2 Osram) dient in Verbindung mit Interferenzfiltern zur Fluoreszenzanregung. Die Auflichtbeleuchtung erfolgt über einen dichroitischen Spiegel (52). Die von den Zellen ausgesandten Fluoreszenzlichtimpulse, deren Höhe ein relatives Maß für den DNS-Gehalt der Zellen ist (30), gelangen über das Mikroskopobjektiv durch den dichroitischen Spiegel, einen Erregerlicht-Sperrfilter und ein Projektiv

auf den Photomultiplier. Dort werden sie in elektrische Impulse umgewandelt und verstärkt (29). Diese Signale werden dann ihrer Höhe entsprechend von einem Vielkanalanalysator klassifiziert und gespeichert. Abb. 4 zeigt ein Schema des gesamten Impulscytophotometers. Nach der Messung zeichnet ein x-y-Schreiber den Speicherinhalt als Verteilungskurve oder Histogramm auf, wobei auf der Abzisse die Impulshöhen bzw. der relative DNS-Gehalt pro Zelle und auf der Ordinate die Zellzahl pro Größenklasse (Kanal des Impulshöhenanalysators) aufgetragen sind. Statistische Fehler werden durch die sehr hohe Zahl von Zellen (30 000 - 300 000), die pro Histogramm gemessen werden, gering gehalten. Bei der Messung sind schließlich Koinzidenzen zu berücksichtigen, deren Werte sich über das Histogramm verteilen, je nachdem, wie zwei oder mehrere Zellen gleichzeitig durch die Meßebene treten. Die Koinzidenzrate ist allein abhängig von der Durchflußgeschwindigkeit und beträgt aufgrund experimenteller Prüfung bei 500 Zellen/sec 1%, bei 1000 Zellen/sec 2% und bei 2000 Zellen/sec über 3% (16). Für die in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen wurde ein Impulscytophotometer ICP 11 der Firma Phywe A.G. Göttingen verwendet (Abb.5).

Abb. 4

Schematische Darstellung des Impulscytophotometers.
1 Xenonlampe, 2 Filter, 3 Blende, 4 Linse, 5 reflektierendes Interferenzfilter, 6 Objektiv, 7 Durchflußkammer für Auflichtbeleuchtung, 8 Filter, 9 Blende, 10 Linse, 11 Photomultiplier, 12 Oszilloskop, 13 Verstärker, 14 Peak-Detektor, 15 Vielkanalanalysator, 16 x-y-Schreiber

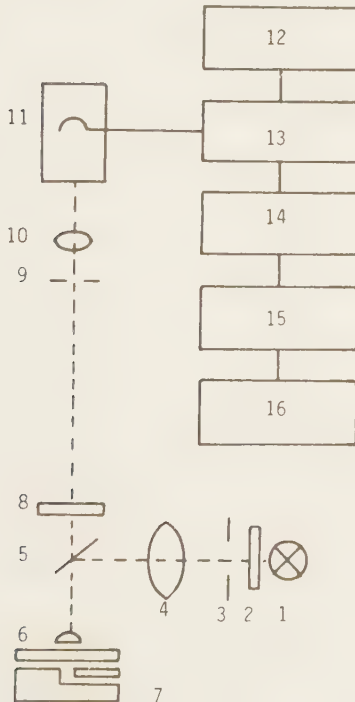
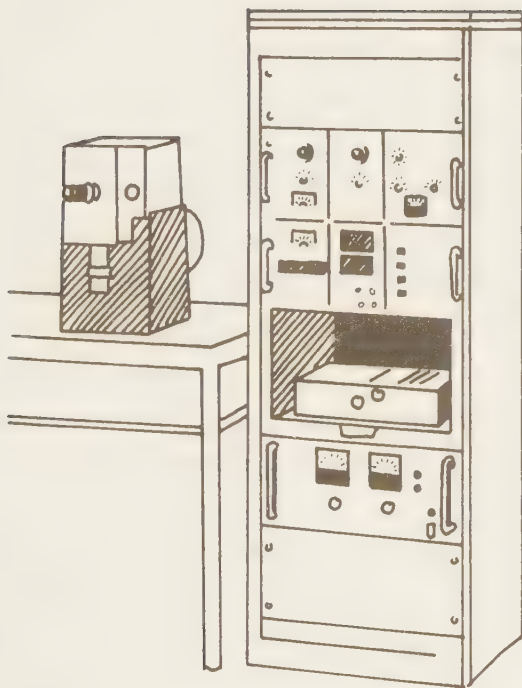


Abb. 5

Impulscytophotometer (ICP 11) (PHYWE AG, Göttingen). In dem Tischgerät befinden sich die Durchflußkammer, die Hochleistungsmikroskopierleuchte mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100 W/2, Osram) mit dem Zündgerät, die optischen Teile der Auflichtfluoreszenzanordnung, ein oder zwei (für Simultanmessungen) Photomultiplier, ein Beobachtungstubus zur Kontrolle der Meßstelle und die Saugpumpe für die Durchflußkammer.

Der Elektronikschrank enthält das Stromversorgungsgerät für die Quecksilberhöchstdrucklampe, die Hochspannungsquelle für den Photomultiplier, einen Verstärker mit variabler Diskriminatorschwelle, einen Impulshöhendetektor, den Impulshöhenanalysator, einen Y-T-Schreiber zur automatischen Datenausgabe in Form von Histogrammen, einen Oszillographen zur dauernden Darstellung des Kernspeicherinhaltes des Impulshöhenanalysators, einen Oszillographen zur Darstellung der Meßimpulse während des Meßablaufes, eine Fehleranzeige, die automatisch die Blockierung oder Verunreinigung der Durchflußkammer anzeigt, einen elektronischen Zähler zur Registrierung der Zahl der gemessenen Zellen, ein Ratemeter zur Kontrolle der Zahl der Zellen pro Suspensionsvolumen, Anschlüsse zur digitalen Datenausgabe auf Lochstreifen, Magnetband, Zifferndrucker oder zum on line-Betrieb mit einem größeren Computer sowie eine Bedienungstafel, von der aus sich das ganze ICP 11 mit nur 4 Drucktasten steuern läßt.



2.2. Das DNS-Histogramm

In der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um DNS-Histogramme von Knochenmarkzellen von Patienten der Medizinischen Klinik der Universität Münster. Ein solches Original-Histogramm zeigt die Abb. 6. Auf der Abszisse ist der relative DNS-Gehalt/Zelle, auf der Ordinate die Zahl der Zellen/DNS-Wert aufgetragen. Das Histogramm zeigt zwei Gipfel, deren Abszissenverhältnis 1:2 beträgt. Der Gipfel bei 2c repräsentiert Zellen mit diploidem Chromosomensatz und einfachem DNS-Gehalt, also Zellen, der $G_1(+G_0)$ -Phase, der Gipfel bei 4c solche mit diploidem Chromosomensatz und doppeltem DNS-Gehalt, also die Zellen, die sich in der G_2 + Mitose-Phase befinden. Der Bereich zwischen beiden Gipfeln entspricht den Zellen der DNS-Synthesephase. Vor dem 2c-Gipfel auftretende Signale sind als repräsentativ für Zellfragmente und ungenügend gefärbte Zellen anzusehen. Die hohe Meßgenauigkeit dieses Verfahrens spiegelt sich darin wider, daß die relative Halbwertsbreite (rel. HWB) der Kurve bei 10 % des Mittelwerts für G_1 -Zellen und darunter liegt. Dadurch ist eine genaue Trennung des $G_1(+G_0)$ -, des S- und des G_2 + Mitose-Anteils möglich (8, 13). Damit ist auch eine Möglichkeit gegeben, aus den Histogrammen eine anteilmäßige Bestimmung der einzelnen Phasen vorzunehmen (6, 30). Bei der Auswertung ist zu beachten, daß sich die Kurvenbereiche der $G_1(+G_0)$ - und der S-Phase-Zellen

Abb. 6

Original-DNS-Histogramm von menschlichen Knochenmarkszellen
(Auf der Abszisse ist der relative DNS-Gehalt pro Zelle
und auf der Ordinate die Zellzahl aufgetragen)

Der G_1 -Gipfel wird zur besseren Vergleichbarkeit der Kurven
jeweils auf Kanal 30 des ICP eingestellt. Bei Kanal 60 liegt
demnach der (G_2+M) -Bereich und zwischen Kanal 60 und 30 das
Plateau der S-Phase. Die Anteile rechts und links des G_1 -Peaks
sind 1:10 verstärkt ausgeschrieben. Als Maß für die Streuung
der Histogramme dient die Breite des G_1 -Gipfels auf seiner
halben Höhe = relative Halbwertsbreite



sowie die Kurvenbereiche der S- und der G_2 + Mitose-Phase-Zellen im Histogramm überschneiden (Abb. 7). Die Berechnung der einzelnen Zellzyklusphasen wird anhand der Abb. 7 verdeutlicht:

- a) Der S-Phase-Anteil ist gegeben durch das Produkt aus Höhe des durch S-Phase-Zellen gebildeten Diagrammteils (Höhe bei a_3) und Abstand zwischen $G_1(+ G_0)$ - und G_2 + Mitose-Gipfel des Histogramms (Abstand $a_2 - a_4$).
- b) Der Anteil der $G_1(+ G_0)$ -Phase-Zellen ergibt sich durch Planimetrieren der Fläche unter der Kurve zwischen a_1 und a_3 abzüglich des halben S-Phase-Anteils.
- c) Der G_2 + Mitose-Phase-Anteil wird bestimmt durch Planimetrieren der Fläche unter der Kurve zwischen a_3 und a_5 abzüglich des halben S-Phase-Anteils.

Der mit dieser Auswertungsmethodik ermittelte Anteil von Zellen in der S-Phase stimmt weitgehend mit dem ^3H -Thymin-Markierungsindex überein (12).

Der DNS-Gehalt als einziger konstanter Parameter der Zelle wird durch die Impulscytrophotometrie für die quantitative Analyse zugänglich und ergibt in Form des DNS-Histogramms eine schnell verfügbare Compartmentverteilung der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen $G_1(+ G_0)$, S und G_2 + Mitose. Damit ist eine Möglichkeit gegeben, mit relativ geringem Aufwand und hoher Genauigkeit die Einflüsse von Cytostatika auf

Abb. 7

DNS-Histogramm von Knochenmarkszellen nach Färbung mit EB.

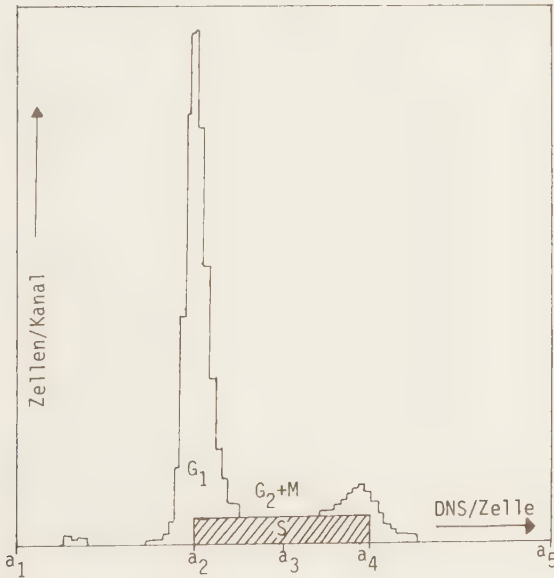
a_1 - a_5 sind Hilfspunkte zur rechnerischen Bestimmung der Zellverteilung auf die einzelnen Zyklusphasen nach GÖHDE (1973):

$$S\text{-Phase} = f(a_3) \cdot (a_4 - a_2)$$

$$G_1(+G_0)\text{-Phase} = \int_{a_1}^{a_3} f(x) dy - 1/2 S$$

$$G_2+M\text{-Phase} = \int_{a_3}^{a_5} f(x) dy - 1/2 S$$

Die Flächenanteile für G_1 , S und (G_2+M) sind zu erkennen.



die Proliferation von Zellpopulationen zu beobachten.

2.3. Fluoreszenzfarbstoffe:

2.3.1. Ethidiumbromid (EB)

Ethidiumbromid (2,7, Diamino-9-phenyl-phenathridin-10-äthylbromid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich zur Anfärbung von doppelsträngigen Polynucleotiden eignet und cytostatische und antivirale Eigenschaften besitzt (37, 46, 47). Ethidiumbromid bindet sich auf zwei verschiedene Arten an Nucleinsäuren:

1. Bei hohen Salzkonzentrationen schiebt sich das flache aromatische Ringsystem von Ethidiumbromid in die hydrophobe Region zwischen zwei Basen in der DNS-Doppelhelix und in doppelsträngigen Bereichen von RNS ein und erschwert dadurch das Ablesen des DNS-Referenzstranges durch die DNS-Polymerase und die DNS-abhängige RNS-Polymerase. Bei dieser intercalären Einlagerung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Ethidiumbromid von 480 nm auf 520 nm, und seine Fluoreszenzintensität nimmt um den Faktor 50 bis 100 zu. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Menge der doppelsträngigen Nucleinsäuren (58).

2. Bei niedrigen Salzkonzentrationen kommt es zusätzlich zu einer elektrostatischen Bindung zwischen dem kationischen

Ethidiumbromid und den anionischen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren. Diese Bindung verändert die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nur gering.

Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich Ethidiumbromid zur spektrofluorometrischen Bestimmung von Nucleinsäuren (46, 47). Die Methode ist spezifisch für doppelsträngige Polynucleotide, kann über ein weites Spektrum von Salzkonzentrationen angewandt werden und hat eine hohe Empfindlichkeit.

2.3.2. Mithramycin (MM)

Mithramycin zählt zu den chromomycin-ähnlichen Substanzen und besitzt antibiotische, antivirale und cytostatische Eigenschaften. Mithramycin bildet in vitro stabile Komplexe mit nativer DNS. In Anwesenheit von Mg^{2+} oder anderen zweiwertigen Ionen ändert sich dabei das Absorptionsspektrum des Mithramycin (38).

Der genaue Bindungsmechanismus zwischen DNS und Mithramycin ist bisher nicht bekannt, jedoch wird eine absolute Spezifität für die Nucleotid-Base Guanin angenommen (38). BARLOGIE u.a. (2) verwendeten Mithramycin zur Fluorochromierung von kultivierten Lymphoma-Zellen und erhielten einwandfreie DNS-Histogramme.

2.4. Bisherige Präparationsmethode von Blut und Knochenmarkzellen für die Impulscytophotometrie (16,33)

1. Das Knochenmark für die zellkinetische Untersuchung wurde aus dem Sternum oder der Spina iliaca posterior superior aspiriert. In der Regel wurde gleichzeitig Venenblut entnommen.

2. Von 2 ml heparinisiertem (Vetren^R) Venenblut bzw. 1 ml heparinisiertem Sternalpunktat wird 1 bzw. 0,5 ml in 10 ml gefiltertes Leitungswasser pipettiert, so daß Hämolyse eintritt.

3. Nach 2 bis 3 Minuten und mehrmaligem Durchmischen werden 4 ml verworfen und schrittweise durch 4 x 1 ml Äthanol 96 % ersetzt. Diese Präparation ist bei + 4° C mehrere Wochen lang haltbar.

4. Zur Messung werden 0,2 bis 1 ml entnommen und durch ein 100 μ -Porenfilter in Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/l 0,9 % NaCl) gegeben. Nach 20 bis 30 Minuten Färbezeit wird mit einem Durchfluß von max. 500 Zellen/sec gemessen. Dabei wird der G₁-Gipfel auf den Kanal 30 apparativ eingestellt.

2.5. Versuchsreihenbeschreibung

Im folgenden wurden acht Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden Modifikationen der Vorbehandlung und Färbung von häma-

tologischem Zellmaterial für die Impulscytophotometrie geprüft und mit der bei 2.4. beschriebenen Präparationsmethode verglichen.

2.5.1. Durchführung der ersten Versuchsreihe:

Suspension von 1 ml heparinisiertem Venenblut in

- a) 10 ml Leitungswasser,
- b) 10 ml 0,1 %iger NaCl-Lösung für 2 Minuten. Die weitere Präparation erfolgt wie bei 2.4.3. und 2.4.4. beschrieben.

In zwei Vergleichsmessungen wurden verglichen:

- 1. Der Flächenanteil unter der Kurve links vom G_1 -Gipfel bzw. Flächengröße unter der Kurve über Kanal 0-20.
- 2. Die Breite des G_1 -Gipfels

2.5.2. Durchführung der zweiten Versuchsreihe:

Aufarbeitung von Knochenmarksmaterial

- a) durch Hämolyse in hypotoner Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/1 0,22 % NaCl) in nativem Zustand. Mindestfärbezeit 20 Minuten.
- b) Nach 2.4.

Als Vergleichswerte wurden bei sieben Messungen gewählt:

- 1. Der Variationskoeffizient (CV). In diesem findet die Streuung z.B. der G_1 -Phase-Zellen ihren Ausdruck. Nach

TRIBUKAIT (61) ergibt sich der CV nach der Formel:

$CV = \frac{B \times 100}{a \times 2,35}$. Dabei ist B gleich der relativen Halbwertsbreite (rel. HWB) des G_1 -Gipfels (Abb. 6) und a gleich dem Kanal unter dem G_1 -Peak.

2. Der prozentuale Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche des DNS-Histogramms. Dieser Wert (z) ergibt sich durch Planimetrieren der Fläche unter der Kurve zwischen Kanal 0-20 (a) und durch Planimetrieren unter der Kurve zwischen Kanal 0-120(b). Der gesuchte Prozentsatz (z) läßt sich aus diesen beiden Werten errechnen: $z = \frac{100 \times a}{b}$.
3. Der prozentuale Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche des DNS-Histogramms. Die Berechnung erfolgt analog 2.5.2.2.

2.5.3. Durchführung der dritten Versuchsreihe:

Präparation von Knochenmarksmaterial entsprechend 2.4. Verglichen wurden die DNS-Histogramme nach unterschiedlich langen Färbezeiten in Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/l 0,9 % NaCl).

Die Färbezeiten waren bei fünf Vergleichsmessungen folgende:

- a) 3,0 h + 25,5 h
- b) 0,5 h + 18 h
- c) 2,5 h + 25 h
- d) 3,0 h + 22 h
- e) 0,5 h, 1,0 h, 2,0 h + 3,0 h

Als Parameter wurden die bei 2.5.2.1. - 2.5.2.3. beschriebenen Werte genommen.

2.5.4. Durchführung der vierten Versuchsreihe:

Präparation von Knochenmark entsprechend 2.4. Färbung des Knochenmarks mit

- a) Ethidiumbromid in phys. Kochsalzlösung (10 mg EB/l 0,9 % NaCl)
- b) Ethidiumbromid in Tris-Puffer (10 mg EB/l Tris-Puffer pH 7,5)
Tris-Puffer pH 7,5 besteht aus: 12 g Tris, 6 g NaCl, 84 ml
1n HCl, aqua dest. ad 1l = 916 ml.

Zwei Messungen - einmal jeweils 45 Minuten Färbezeit, ein andermal jeweils 90 Minuten Färbezeit - wurden mittels der 2.5.2.1. - 2.5.2.3. genannten Parameter verglichen.

2.5.5. Durchführung der fünften Versuchsreihe:

Aufarbeitung von Knochenmarksmaterial nach 2.4. und Färbung mit

- a) Ethidiumbromid (10 mg EB/l 0,9 % NaCl)

b) Mithramycin (5 mg MM/100 ml aqua dest. + 0,305 MgCl₂).

Drei Messungen wurden mit folgenden Parametern verglichen:

1. CV (s. 2.5.2.1.)
2. Flächengröße unter der Kurve über Kanal 0-20 (s. 2.5.2.2.)
3. Flächengröße unter der Kurve über Kanal 75-120 (s. 2.5.2.3.)
4. 625-Wert. Dies ist ein Maß für die Fluoreszenzimpulshöhe.

Dieser Wert wird angegeben als Kanallage des G₁-Gipfels bei einer Standardeinstellung der Hochspannung (HV) am Impulscytophotometer auf einen relativen Wert von 625.

2.5.6. Durchführung der sechsten Versuchsreihe:

Präparation von Knochenmarksmaterial bis zur Färbung nach der üblichen Methode (s. 2.4.) Danach jeweils zwei verschiedene Färbungen:

1. Ethidiumbromid (10 mg EB/1 0,9 % NaCl). Färbezeit: mind. 20 Min.
2. Mischung von Ethidiumbromid (10 mg EB/1 0,9 % NaCl) und Mithramycin (5 mg MM/100 ml aqua dest. + 0,305 g MgCl₂) in einem molaren Verhältnis von 1:2. Färbezeit: mind. 20 Min.

Neun Vergleichsmessungen wurden durchgeführt: Als Parameter wurden die bei 2.5.5.1. - 2.5.5.4. beschriebenen gewählt.

2.5.7. Durchführung der siebten Versuchsreihe:

Prüfung zwei verschiedener Färbemethoden von Knochenmark:

1. Präparation und Färbung wie in 2.4. beschrieben.
2. Nach üblicher Präparation (s. 2.4.) Färbung zuerst mit Ethidiumbromid (10 mg EB/l 0,9 % NaCl). Nach unterschiedlichen Zeitspannen wurde darauf dieses Knochenmark mit Mithramycin im molaren Verhältnis von 1:2 (5 mg MM/100 ml aqua dest. + 0,305 g MgCl_2) nachgefärbt.
Färbezeit von EB: zwischen 1/2 h + 96 h
Färbezeit von MM: zwischen 1/2 h + 43 h.

Neun Vergleichsmessungen wurden durchgeführt. Verglichen wurden die DNS-Histogramme mittels der bei 2.5.5.1. - 2.5.5.4. beschriebenen Parameter.

2.5.8. Durchführung der achten Versuchsreihe:

72 KM-Punktate wurden auf zweierlei Art präpariert:

1. Ein Teil des Knochenmarks wurde - wie in 2.4. beschrieben - behandelt.
2. Ein anderer Teil des Knochenmarks wurde in den ersten drei Präparationsschritten ebenfalls entsprechend der Anleitung in 2.4. behandelt. Danach wurde es folgendermaßen gefärbt: 0,2-1 ml des vorpräparierten Knochenmarks werden entnommen und durch ein 100 μ -Porenfilter in Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/l 0,9 % NaCl) gegeben. Nach einer Färbezeit von mindestens einer Stunde wird Mithramycin im molaren Verhältnis von 1:2 (5 mg MM/100 ml aqua dest. + 0,305 g MgCl_2)

hinzugefügt. Nach einer weiteren Färbezeit von mindestens einer Stunde wird mit einem Durchfluß von max. 500 Zellen/sec gemessen. Dabei wird der G_1 -Gipfel auf den Kanal 30 apparativ eingestellt.

Die Messungen wurden verglichen. Als Parameter wurden gewählt: CV (s. 2.5.2.1.), Fläche über Kanal 0-20 (s. 2.5.2.2.), Fläche über Kanal 75-120 (s. 2.5.2.3.), 625-Wert (s. 2.5.5.4.).

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich von Messungen nach Leitungswasser-Hämolysen mit Messungen nach Hämolysen mit hypotoner Kochsalzlösung

Ergebnis: Die DNS-Histogramme nach Hämolysen mit 0,1 %iger NaCl-Lösung zeigen einen deutlichen Anstieg der Fläche links von G_1 (< Kanal 20) und eine Verbreiterung des G_1 -Gipfels gegenüber den Histogrammen nach Leitungswasser-Hämolysen (Abb. 8).

3.2. Vergleich von DNS-Histogrammen von Knochenmark, das - wie in 2.4. beschrieben - präpariert wurde, mit Histogrammen von Knochenmark, das in hypotoner Ethidiumbromidlösung hämolysiert und in nativem Zustand gefärbt wurde.

Ergebnis: Die Präparationsmethode, natives Knochenmark in hypotoner Ethidiumbromidlösung zu hämolysieren und zu färben, verursacht in 5 von 7 Fällen eine ungenügende Anfärbung der Zellen (erkennbar an der Fläche über Kanal 0-20) und in über 50 % der Fälle eine Vergrößerung des CV. Auch in der Anzahl der Zellverklebungen (erkennbar an der Fläche über Kanal 75-120) wurde keine Verbesserung gegenüber der Alternativmethode erzielt (Tab. 1).

Abb. 8

Histogramme von peripherem Blut nach zweiminütiger
Hämolyse in

- a) Leitungswasser
- b) 0,1 % NaCl
- c) Leitungswasser
- d) 0,1 % NaCl

Die Histogramme nach Hämolyse in 0,1 % NaCl (b+d) zeigen einen deutlichen Anstieg der Fläche unter der Kurve links von G_1 ($< \text{Kanal } 20$) und eine Verbreiterung des G_1 -Gipfels gegenüber den entsprechenden Histogrammen nach Leitungswasser-Hämolyse (a+c)

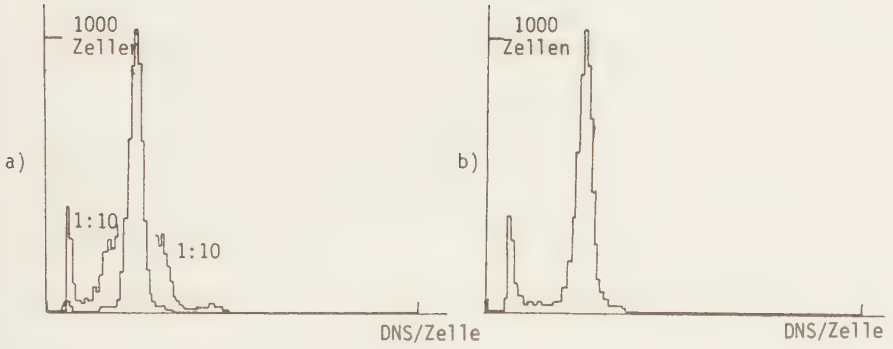


Tabelle 1

Vergleich von DNS-Histogrammen von nativem Knochenmark nach Färbung mit hypotoner Ethidiumbromidlösung mit DNS-Histogrammen von Knochenmark, das nach 2.4. behandelt wurde, mittels der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche und Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche (s. alle 2.5.8.).

Lfd.- Vers.- reihen- Nr.	Färbe- zeit (min)	Präparation a (hypoton)			Präparation b (isoton)		
		CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)
1	30	12,35	2,93	1,19	12,60	4,58	0,16
2	20	10,63	0,55	0	10,27	1,96	0,06
3	60	7,33	40,16	0	8,80	0,76	0,28
4	180	9,11	30,20	0,91	7,09	1,79	0,45
5	30	11,34	3,35	3,03	7,33	1,23	0,52
6	30	11,34	21,21	0	7,09	0,71	0
7	30	9,92	8,76	0,37	9,92	4,46	1,49

3.3. Vergleich von DNS-Histogrammen von Knochenmark nach unterschiedlich langen Färbezeiten mit Ethidiumbromid

Ergebnis: Durch Verlängerung der EB-Färbedauer über 30 Minuten hinaus bis max 25,5 Stunden verändern sich die CV nicht signifikant. Ebenso tritt keine wesentliche Veränderung der Zellfragmentzahl oder Anfärbbarkeit der Zellen (erkennbar an der Fläche über Kanal 0-20) und der Zellverklebungsrates (erkennbar an der Fläche über Kanal 75-120) ein (Tab. 2, Abb. 9).

Tabelle 2

Vergleich von DNS-Histogrammen von Knochenmark nach unterschiedlich langen Färbezeiten mit EB mittels der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche und Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche (s. alle 2.5.8.).

Vergleichsmessung	Färbezeit (h)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)
a	3	5,67	1,52	0,30
	25,5	5,67	2,12	0,44
b	0,5	7,09	1,43	2,04
	18	5,67	1,55	1,93
c	2,5	4,25	1,19	0
	25	4,25	1,55	0,07
d	3	5,67	2,71	0
	22	5,67	2,13	0
e	0,5	10,27	0,85	0,62
	1	8,80	1,12	0,60
	2	9,11	1,51	0,64
	3	8,80	1,14	0,91

Abb. 9

DNS-Histogramme von Knochenmark (Vergleichsmessung c der Tab. 2) nach

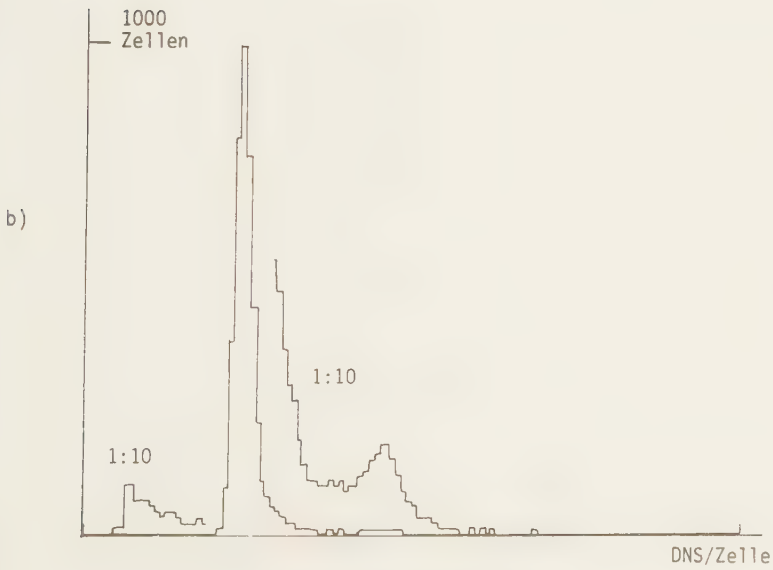
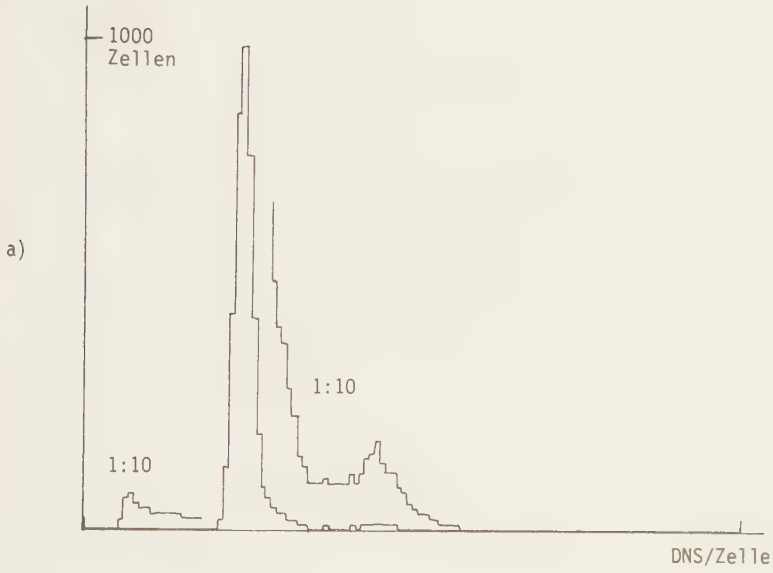
a) 2 1/2-stündiger Färbung mit Ethidiumbromid

(10 mg EB/l 0,9 % NaCl)

b) 25-stündiger Färbung mit Ethidiumbromid

(10 mg EB/l 0,9 % NaCl)

Das Histogramm nach 25-stündiger Färbung mit EB zeigt gegenüber dem Histogramm nach 2 1/2 Stunden Färbung mit EB den gleichen CV (4,25 %), einen unwesentlichen Anstieg der Fläche unter der Kurve über Kanal 0-20 von 1,19 % auf 1,55 % und über Kanal 75-120 von 0 % auf 0,07 %



3.4. Vergleich von zwei verschiedenen Ethidiumbromidlösungen

Ergebnis: Bei dem mit EB/Tris gefärbten Knochenmark erhöht sich deutlich der Anteil der Fläche unter der Kurve links vom G_1 -Gipfel, ein Zeichen für eine ungenügende Anfärbung der Zellen (Abb. 10). Die vergrößerte relative Halbwertsbreite des G_1 -Gipfels deutet außerdem auf eine erhöhte Streubreite der Zellen hin.

3.5. Vergleich zwischen Ethidiumbromidfärbung und Mithramycinfärbung

Ergebnis: Nach MM-Färbung zeigt sich deutlich eine Erhöhung der Fluoreszenzsignale, erkennbar am 625-Wert (s. 2.5.8.). Jedoch sind die Zellen nach MM-Färbung weniger gut angefärbt als nach EB-Färbung, was sich an der Veränderung der Fläche unter der Kurve über Kanal 0-20 ablesen läßt. Die Streubreite und die Verklebungsrates der Zellen ändern sich nicht signifikant (Abb. 11).

3.6. Vergleich zwischen Ethidiumbromidfärbung und Ethidiumbromid-Mithramycinfärbung

Ergebnis: Die Tabelle 3 zeigt, daß die Fluoreszenzlichtimpulse nach EB/MM-Färbung um ein Mehrfaches höher sind als nach

Abb. 10

Histogramme von Knochenmark nach

- a) 45-minütiger Färbung mit EB/NaCl
- b) 45-minütiger Färbung mit EB/Tris-Puffer
- c) 90-minütiger Färbung mit EB/NaCl
- d) 90-minütiger Färbung mit EB/Tris-Puffer

Die Histogramme nach Färbung mit EB/Tris-Puffer (b,d) zeigen eine Vergrößerung der rel. Halbwertsbreite und der Fläche unter der Kurve links vom G_1 -Gipfel gegenüber den Histogrammen nach Färbung mit EB/NaCl (a,c)

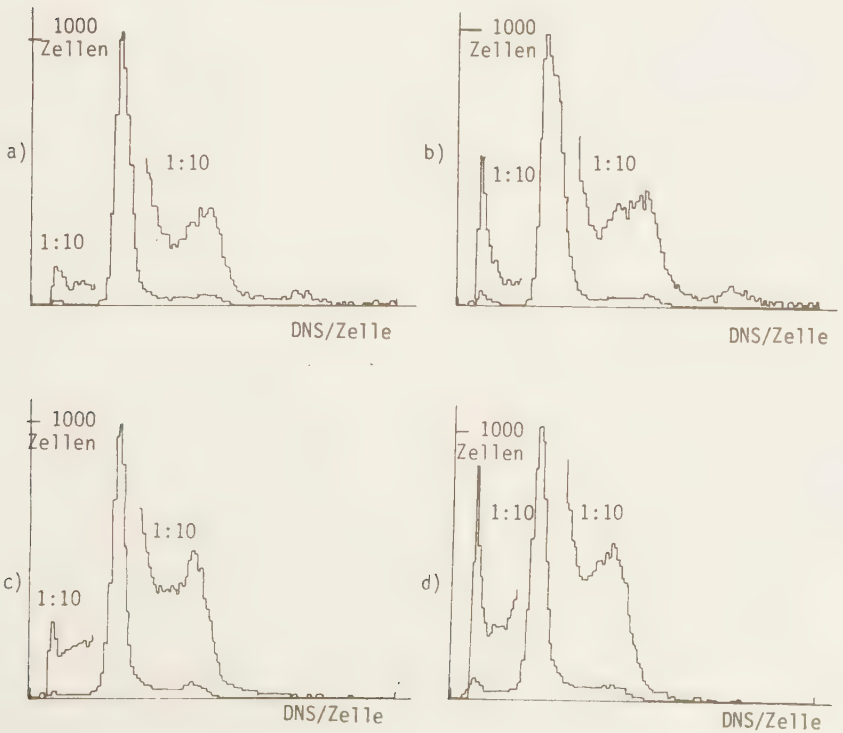
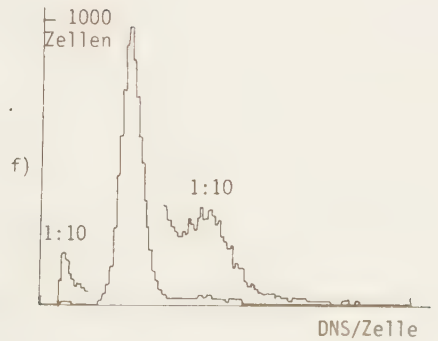
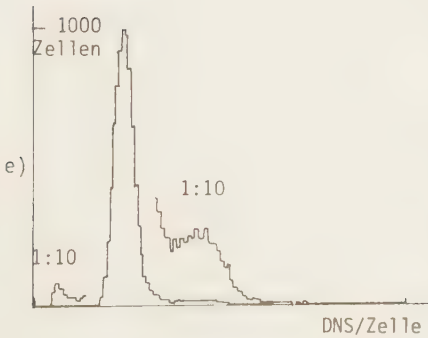
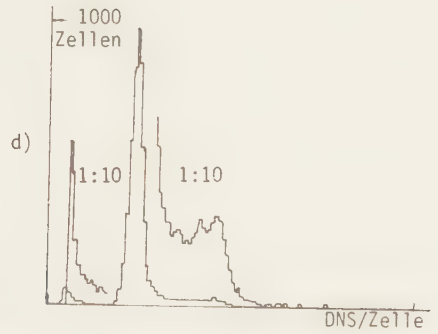
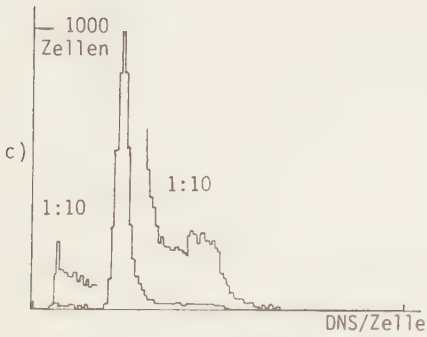
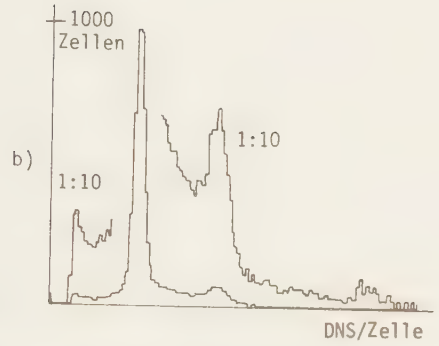
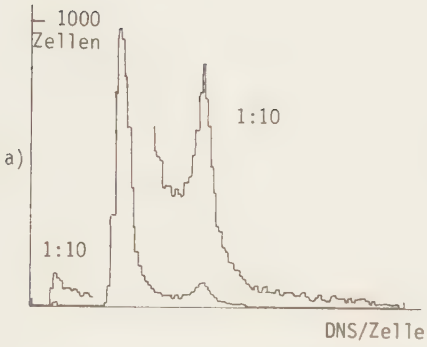


Abb. 11

Die KM-Histogramme nach MM-Färbung (b,d,f) lassen gegenüber entsprechenden Histogrammen nach EB-Färbung (a,c,e) eine Erhöhung des Flächenanteils unter der Kurve über Kanal 0-20 erkennen. Der 625-Wert (2.5.5.4.) ist nach MM-Färbung deutlich höher als nach EB-Färbung



EB-Färbung. Die CV sind nach EB/MM-Färbung bei 5 Messungen geringer, bei 3 Messungen größer und bei 1 unverändert. Weiter wird deutlich, daß der Flächenanteil über Kanal 0-20 in über 50% der Fälle nach EB/MM-Färbung auffallend ansteigt, während die Verklebungsrate (erkennbar an der Fläche über Kanal 75-120) sich nicht wesentlich verändert.

Da eine deutliche Verbesserung der Impulshöhe in allen Fällen nach EB/MM-Färbung eintrat und es den Anschein hatte, daß geringere CV deswegen nicht ebenso oft erzielt wurden, weil sich die Knochenmarkszellen noch nicht optimal anfärbt hatten - so wurde der Flächenanstieg über Kanal 0-20 interpretiert - galt der nächste Versuch einer zeitlich abgestuften 1:2-molaren EB/MM-Färbung.

Tabelle 3

Vergleich zwischen DNS-Histogrammen von Knochenmark nach EB-Färbung und DNS-Histogrammen von Knochenmark nach EB/MM-Färbung mittels der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche und 625-Wert (s. alle 2.5.8.).

Tabelle 3

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625-Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625-Wert (Kanal)
1	7,09	8,50	0,98	42	7,09	2,58	0,96	17
2	12,15	25,22	0,01	>120	12,60	4,58	0,16	32
3	4,25	3,92	0,02	>120	10,27	1,96	0,06	33
4	11,73	5,38	1,28	123	9,92	4,46	1,49	22
5	9,92	3,02	1,15	61	7,09	3,85	0,33	17
6	5,67	9,77	1,46	78	8,51	1,73	1,39	21
7	15,60	0,65	0,94	76	9,92	0,74	0,16	18
8	7,09	3,19	3,07	118	7,33	1,18	0,78	24
9	5,86	1,63	0,38	>120	7,33	1,23	0,52	32

3.7. Vergleich zwischen EB-Färbung und einer zeitlich abgestuften EB/MM-Färbung

3.7.1. Ergebnis der Vergleichsmessung 1 (Tab. 4a) (Abb. 12)

Tabelle 4a

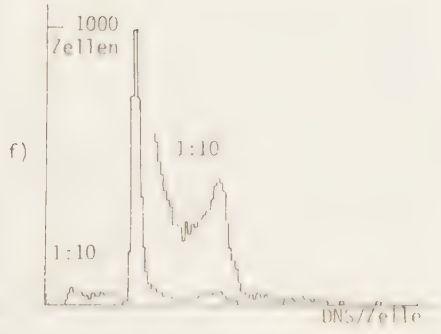
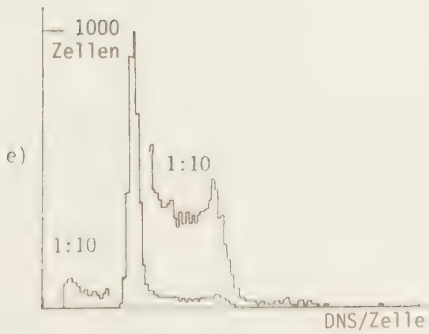
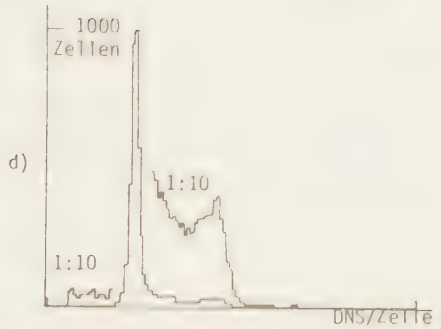
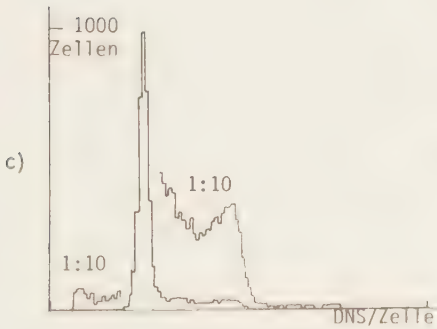
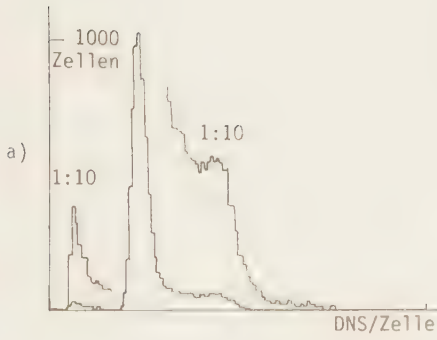
Vergleich von DNS-Histogrammen von Knochenmark nach EB-Färbung mit DNS-Histogrammen von Knochenmark nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung anhand der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche und 625-Wert (s. alle 2.5.8.).

Vergleichsmessung 1	2 h EB	1/2 h EB danach: 1/2 h MM	1 h EB danach: 1 h MM	2 h EB danach: 1 h MM	25 h EB danach: 1 h MM	48 h EB danach: 3 h MM
CV (%)	7,09	5,67	4,11	4,25	4,25	4,25
625-Wert (Kanal)	22	>120	>120	>120	>120	>120
Fläche Kanal 0-20 (%)	2,9	2,6	1,42	1,35	1,77	1,07
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,44	0,31	0,37	0,12	0,59	0,85

Abb. 12

Histogramme von Knochenmark nach EB-Färbung (a) und nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung mit verschiedenen Einzelfärbezeiten (b,c,d,e,f)

Der CV verbessert sich von 7,09 % nach EB-Färbung auf 4,11 % nach 1-stündiger EB- und darauffolgender 1-stündiger MM-Färbung. Der Anteil der Fläche unter der Kurve über Kanal 0-20 verringert sich von 2,9 % nach EB- bzw. 2,6 % nach 30-minütiger EB- und darauffolgender 30-minütiger MM-Färbung auf unter 1,5 % nach Einzelfärbezeiten von EB und MM von mindestens 1 Stunde. Nach Einzelfärbezeiten von EB und MM von mind. 1 Stunde verschwindet der nach links verbreiterte unsymmetrische G_1 -Gipfel nach 30-minütiger EB- und darauffolgender 30-minütiger MM-Färbung (b). Nach Verlängerung der Einzelfärbezeit von EB auf über 24 Stunden (e,f) nimmt die Fläche unter der Kurve über Kanal 75-120 von unter 0,5 (a,b,c,d) auf max. 0,85 % (f) zu. Der 625-Wert liegt nach EB/MM-Färbung immer über 120



Nach zeitlich abgestufter 1:2-molarer EB/MM-Färbung sind die Fluoreszenzlichtimpulse - wie schon bei der 6. Versuchsreihe - wiederum um ein Mehrfaches ($>5x$) höher (erkennbar am 625-Wert) und die CV in allen Fällen kleiner. Der nach links verbreiterte unsymmetrische G_1 -Gipfel nach 30-minütiger Färbung mit EB und darauffolgender ebenfalls 30-minütiger Färbung mit MM - ein Zeichen für nicht ausreichende Anfärbung der Zellen - läßt sich durch längere Färbedauer von EB und von MM korrigieren, wie z.B. 1 Stunde EB und danach 1 Stunde MM. Die besten Ergebnisse wurden nach 2-stündiger EB- und 1-stündiger MM-Färbung erzielt. Nach längerer EB-Färbezeit (bis zu 48 Stunden) zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen, eine geringe Zunahme der Zahl der Zellverklebungen (erkennbar an der Fläche über Kanal 75-120) ausgenommen (Abb. 12).

3.7.2. Ergebnis der Vergleichsmessungen 2-9 (Tab. 4b)

Tabelle 4b

Vergleich von DNS-Histogrammen von Knochenmark nach EB-Färbung mit DNS-Histogrammen von Knochenmark nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung anhand der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche und 625-Wert (s. alle 2.5.8.).

Vergleichsmessung 2	3/4 h EB	1/2 h EB danach: 1 h MM	96 h EB danach: 1 h MM
CV (%)	5,67	5,67	4,25
625-Wert (Kanal)	28	>120	>120
Fläche Kanal 0-20 (%)	1,42	2,08	1,45
Fläche Kanal 75-120 (%)	0	0	0,59

Vergleichsmessung 3	1 1/4 h EB	1/2 h EB danach: 3/4 h MM	24 h EB danach: 1 1/2 h MM
CV (%)	13,72	22,79	6,86
625-Wert (Kanal)	24	88	123
Fläche Kanal 0-20 (%)	9,64	6,68	7,25
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,45	0	0

Vergleichsmessung 4	1 h EB	1 h EB danach: 1/2 h MM	24 h EB danach: 1 h MM
CV (%)	8,80	6,07	4,25
625-Wert (Kanal)	26	>120	123
Fläche Kanal 0-20 (%)	9,76	3,76	0,69
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,28	0,60	1,65

Vergleichsmessung 5	3/4 h EB	24 h EB danach: 1/2 h MM	1 h EB danach: 1 h MM
CV (%)	7,09	7,33	5,67
625-Wert (Kanal)	22	>120	>120
Fläche Kanal 0-20 (%)	1,79	4,42	1,42
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,45	0,57	0,71

Vergleichsmessung 6	2 h EB	2 h EB danach: 1 1/2 h MM	2 h EB danach: 23 h MM
CV (%)	5,67	5,67	7,09
625-Wert (Kanal)	27	>120	>120
Fläche Kanal 0-20 (%)	2,36	2,05	1,53
Fläche Kanal 75-120 (%)	2,96	1,86	2,77

Vergleichsmessung 7	22 h EB	3 h EB danach: 18 h MM	3 h EB danach: 43 h MM
CV (%)	5,67	4,25	4,25
625-Wert (Kanal)	21	>120	53
Fläche Kanal 0-20 (%)	2,13	6,10	7,47
Fläche Kanal 75-120 (%)	0	0	0

Vergleichsmessung 8	3 h EB	2 1/2 h EB danach: 1 h MM	25 h EB danach: 1 h MM	2 1/2 h EB danach: 23 h MM
CV (%)	5,67	4,25	4,25	4,25
625-Wert (Kanal)	29	>120	>120	>120
Fläche Kanal 0-20 (%)	1,52	1,16	1,19	1,50
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,30	0,21	0,40	0,47

Vergleichsmessung 9	5 1/2 h EB	5 h EB danach: 1 h MM	5 h EB danach: 25 h MM
CV (%)	8,80	7,33	8,23
625-Wert (Kanal)	18	>120	105
Fläche Kanal 0-20 (%)	2,18	2,1	1,51
Fläche Kanal 75-120 (%)	0,52	0,47	0,30

Die Tabellen dieser 8 Vergleichsmessungen bestätigen das Ergebnis der 1. Vergleichsmessung:

Die Impulse nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung in einem molaren Verhältnis von 1:2 sind um ein Mehrfaches höher als nach alleiniger EB-Färbung. Die besten Ergebnisse wurden erzielt nach einer Färbung mit EB von mindestens einer Stunde

und darauf mit MM von ebenfalls mindestens einer Stunde. Eine kürzere Färbungszeit als eine Stunde - gleichgültig mit welchem Farbstoff - hatte einen nach links verbreiterten unsymmetrischen G_1 -Gipfel (Abb. 12) zur Folge mit gegenüber den Einzelfärbungen von mindestens einer Stunde vergrößerten Halbwertsbreiten von G_1 bzw. mit geringeren prozentualen Verbesserungen des CV, der nach EB-Färbung erzielt wurde (Abb. 13).

3.8. Vergleich zwischen EB-Färbung und einer zeitlich abgestuften EB/MM-Färbung mit einer Mindesteinzelfärbezeit von einer Stunde

Ergebnis (Tab. 5):

Tabelle 5 (s. Seite 49)

Vergleich zwischen DNS-Histogrammen von Knochenmark nach Färbung mit EB und DNS-Histogrammen von Knochenmark nach zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung mit einer Mindesteinzelfärbezeit von einer Stunde anhand der Parameter CV, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche, Anteil der Kurvenfläche über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche und 625-Wert (s. alle 2.5.8.).

Abb. 13

Prozentuale Verbesserung bzw. Verschlechterung von KM-Histogrammen nach EB-Färbung durch eine zeitlich abgestufte EB/MM-Färbung. Vergleichsparameter ist der CV.

Der errechnete CV nach alleiniger Färbung mit EB wird willkürlich als Nullpunkt auf die Abszisse gesetzt. Mit diesem Wert werden die CV nach EB/MM-Färbungen verglichen und die jeweilige max. prozentuale Verbesserung oder Verschlechterung in den einzelnen Messungen (M) in das Diagramm eingetragen. Die schraffierten Säulen sind die prozentualen Änderungen nach Einzelfärbungszeiten von weniger als 1 Std. mit EB und/oder MM. Diese Färbemethode wurde nur in den ersten 5 Vergleichsmessungen benutzt. Als weiße Säulen sind die prozentualen Änderungen des CV nach EB/MM-Färbung mit Einzelfärbezeiten von mind. 1 Std. eingetragen. Diese Färbung wurde in allen 9 Messungen (M) angewandt. Das Diagramm zeigt eine Verbesserung des CV um bis zu 52 % in 8 von 9 Fällen nach EB/MM-Färbung und Einzelfärbezeit von mind. 1 Std. Nach EB/MM-Färbung und Einzelfärbezeit von EB und/oder MM von weniger als 1 Std. wird in 2 von 5 Fällen eine Verbesserung des CV um 20 % und 31 %, in 1 Fall keine Veränderung und in 2 Fällen eine Verschlechterung um 3 % und 66 % erreicht.

prozentuale Verbesserung
des CV (%)

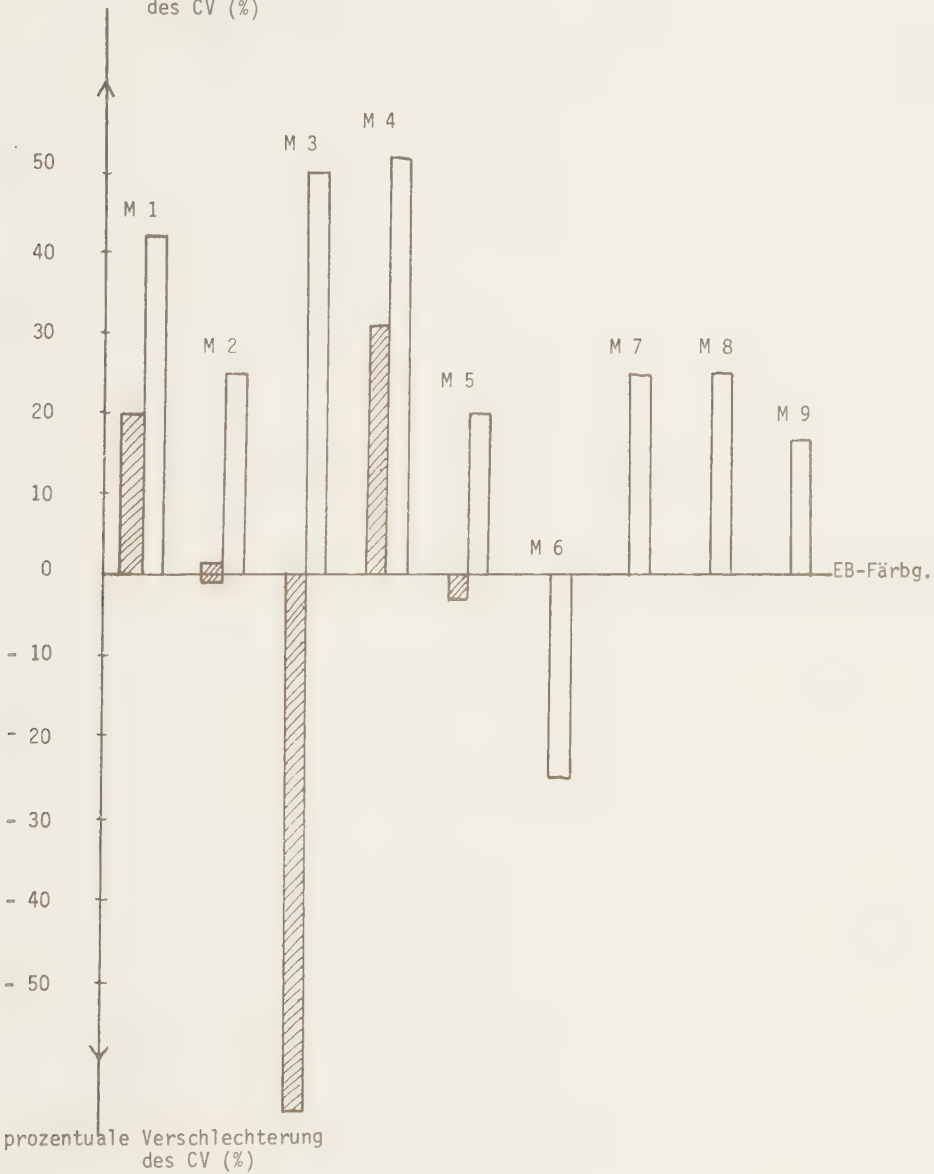


Tabelle 5

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)
1	7,09	0,30	0	115	7,33	3,44	0	13
2	7,09	0,88	0	>120	5,67	3,11	0,08	27
3	4,25	1,73	0,16	>120	5,67	1,85	0,31	32
4	12,76	2,97	0,15	>120	7,09	3,16	0,14	24
5	4,25	19,11	0,39	>120	6,86	11,83	1,00	25
6	7,09	1,67	1,57	100	7,09	4,40	1,33	17
7	8,80	4,48	0,69	125	10,27	1,38	0,82	14
8	8,51	16,17	0,19	>120	11,73	13,22	0,17	13
9	4,25	1,36	0,03	>120	5,67	2,05	0,10	25
10	7,09	2,34	0	>120	8,51	0,90	1,05	25
11	5,67	2,07	0,88	>120	5,67	2,20	1,06	27
12	8,51	1,34	0,47	110	9,92	1,47	0,52	15
13	9,92	1,22	0,31	>120	8,51	1,75	0,08	26
14	8,51	3,33	0,12	>120	11,34	3,47	0,71	20
15	5,67	3,20	0	>120	9,92	6,01	0	28
16	4,25	3,31	0	>120	11,34	7,01	0,15	31

Forts.
Tabelle 5

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)
17	4,25	8,20	0	>120	8,51	19,74	0	26
18	7,44	5,88	1,98	>120	5,67	7,22	0,48	31
19	8,51	2,88	0,36	109	12,76	4,87	0,36	19
20	4,25	1,64	0,25	125	12,76	2,39	0,22	22
21	4,25	1,74	0,09	124	11,34	2,97	0,41	19
22	4,25	2,41	0	>120	7,09	9,52	0,02	20
23	5,67	2,00	0	>120	5,67	8,83	0,10	32
24	4,25	0,91	0	130	5,67	1,17	0	19
25	5,67	1,90	0,63	>120	8,80	3,33	0,87	25
26	4,25	0,90	2,86	118	8,51	2,36	2,27	15
27	5,67	2,59	1,04	>120	8,51	4,43	1,19	23
28	4,25	0,91	0	>120	5,67	1,52	0	28
29	7,33	12,84	1,08	>120	7,09	11,66	0,62	25
30	5,67	15,73	0	>120	12,76	3,99	0,53	20
31	5,67	2,72	2,83	>120	7,09	3,40	2,56	26
32	8,51	1,56	0,14	>120	8,51	1,27	0,25	27

Forts.
Tabelle 5

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)
33	5,67	2,44	0	125	7,09	2,21	0,02	15
34	7,09	0,79	0,35	110	5,67	3,44	0,06	15
35	4,25	0,95	0,71	120	7,09	3,94	0,06	13
36	8,51	2,25	0,35	>120	7,09	3,72	0,91	25
37	5,67	3,29	0	>120	7,09	7,13	0,11	25
38	7,09	8,28	0,02	>120	8,51	1,44	0,24	26
39	7,09	6,04	0,93	>120	7,09	1,77	1,53	27
40	9,92	1,20	0,04	114	7,09	6,66	0,15	17
41	7,09	2,48	0,27	125	8,51	2,14	0,11	17
42	4,25	1,20	0,05	130	8,51	3,26	0,03	14
43	5,67	1,03	0	>120	8,51	2,03	0	21
44	9,92	3,08	-	>120	11,34	4,37	-	26
45	7,09	1,31	1,84	>120	7,09	3,59	2,16	26
46	7,09	1,40	0,76	>120	5,67	2,51	0,79	25
47	7,09	4,00	0,18	>120	7,09	1,76	0,11	28
48	5,67	1,33	0,37	>120	7,09	1,32	0,19	29

Forts.
Tabelle 5

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)
49	5,67	2,78	2,70	>120	7,09	4,29	2,69	30
50	11,34	16,41	0	>120	15,60	15,64	0,21	19
51	7,09	13,09	0	>120	7,09	3,30	0,08	27
52	4,25	2,88	0	>120	7,09	5,06	0,31	26
53	9,92	11,06	1,42	>120	11,34	12,20	1,85	29
54	5,67	3,72	1,15	124	7,09	6,73	1,18	16
55	4,25	1,68	1,64	95	8,51	3,20	1,90	15
56	5,67	4,40	0	>120	9,60	12,02	0,07	22
57	8,80	4,90	0,49	>120	7,09	5,66	0,45	25
58	4,25	0,70	0,03	>120	8,51	1,35	0,11	31
59	5,67	0,60	0,32	>120	7,09	1,23	0,26	30
60	5,67	0,68	0,29	>120	7,09	1,00	0,16	27
61	5,67	1,06	1,53	123	7,09	7,36	1,46	18
62	4,25	1,34	1,40	>120	7,09	3,18	2,39	21
63	4,25	2,74	0,23	>120	7,09	2,36	0,92	32
64	4,25	1,46	0	125	7,09	3,79	0,02	17

Forts.
Tabelle 5

	EB/MM-Färbung				EB-Färbung			
	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)	CV (%)	Fläche Kanal 0-20 (%)	Fläche Kanal 75-120 (%)	625- Wert (Kanal)
65	7,09	1,70	0,76	117	5,67	6,17	0,62	19
66	4,25	0,89	0	>120	5,67	0,85	0,25	28
67	5,67	2,31	0	>120	9,92	14,97	0,10	23
68	7,09	13,37	0	>120	5,67	1,63	0	28
69	7,09	0,75	0,17	>120	7,09	2,99	0,22	25
70	5,67	18,06	0	>120	7,09	1,14	0	20
71	8,51	2,75	0,36	125	9,92	5,52	0,87	11
72	4,25	1,44	1,15	126	7,09	3,52	1,15	17

EB/MM-Färbung:

$$CV: \mu_1 = 6,37 \%$$

$$6^2 = 3,85$$

$$6 = 1,96$$

$$f(M) = \frac{1}{6 \cdot \sqrt{2\pi}} = 0,2$$

$$f(M-6) = f(4,41) = 0,12$$

$$f(4,25) = 0,11$$

$$f(3) = 0,05$$

$$f(1) = 0,005$$

$$f(7,09) = 0,19$$

$$f(5,67) = 0,19$$

EB-Färbung:

$$CV: \mu_2 = 8,04 \%$$

$$6^2 = 4,46$$

$$6 = 2,11$$

$$f(M) = 0,19$$

$$f(M-6) = f(5,93) = 0,11$$

$$f(3) = 0,01$$

$$f(7,09) = 0,17$$

$$f(5,67) = 0,10$$

EB/MM-Färbung:

Fläche Kanal 0-20:

$$\begin{aligned}\mu_1 &= 3,92 \% \\ \sigma^2 &= 21,27 \\ \sigma &= 4,61 \\ f(\mu) &= \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} = 0,09 \\ f(\mu + \sigma) &= \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-1/2} = 0,05 \\ f(2) &= 0,08 \\ f(10) &= 0,04 \\ f(0) &= 0,06\end{aligned}$$

EB-Färbung:

Fläche Kanal 0-20:

$$\begin{aligned}\mu_2 &= 4,62 \% \\ \sigma^2 &= 15,48 \\ \sigma &= 3,93 \\ f(\mu) &= 0,10 \\ f(\mu + \sigma) &= 0,06 \\ f(2) &= 0,08 \\ f(10) &= 0,04 \\ f(0) &= 0,05\end{aligned}$$

Fläche Kanal 75-120:

$$\begin{aligned}\mu_1 &= 0,50 \% \\ \sigma^2 &= 0,50 \\ \sigma &= 0,71 \\ f(\mu) &= 0,56 \\ f(\mu + \sigma) &= 0,34 \\ f(0) &= 0,44 \\ f(0,25) &= 0,53 \\ f(1,5) &= 0,21 \\ f(2) &= 0,06\end{aligned}$$

Fläche Kanal 75-120:

$$\begin{aligned}\mu_2 &= 0,58 \% \\ \sigma^2 &= 0,49 \\ \sigma &= 0,70 \\ f(\mu) &= 0,57 \\ f(\mu + \sigma) &= 0,35 \\ f(0) &= 0,40 \\ f(0,25) &= 0,51 \\ f(1,5) &= 0,24 \\ f(2) &= 0,07\end{aligned}$$

Das Ergebnis spiegelt sich in den Tabellen und den nach ihnen erstellten (s. Rechnungen unter Tabelle 5) Gauß'schen Glockenkurven ¹⁾ (Abb. 14-16) wider. Vier Aussagen können danach gemacht werden:

1. Nach bei 2.5.8.2. beschriebener zeitlich abgestufter EB/MM-Färbung waren in 100% der Fälle die Fluoreszenzlichtimpulse um ein Vielfaches (4-8x) höher als nach herkömmlicher EB-Färbung. Parameter war der 625-Wert.
2. Die Verbesserung der CV nach EB/MM-Färbung zeigt Abb. 14.
3. Die Verbesserung der Anfärbbarkeit der Zellen nach EB/MM-Färbung zeigt Abb. 15. Parameter war der Flächenanteil über Kanal 0-20 an der Gesamtkurvenfläche.
4. Das Verhalten hinsichtlich der Zahl der Zellverklebungen nach EB- und nach EB/MM-Färbung zeigt Abb. 16. Parameter war der Flächenanteil über Kanal 75-120 an der Gesamtkurvenfläche.

Nach dem U-Test bei Rangaufteilung nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (56) ist die Verbesserung der CV nach EB/MM-Färbung (Abb. 14) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% ($p < 0,001$) hoch signifikant.

Auch die Signifikanz der dritten Aussage, daß nach EB/MM-Färbung die Fläche unter der Kurve über Kanal 0-20 geringer wird, ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger

1) Gauß'sche Glockenkurve ist der Graph der Dichte $f(x)$ der Normalverteilung mit Erwartungswert μ und Varianz σ^2 .

Abb. 14

Gauß'sche Verteilungskurven der Verteilungskurven der CV-Werte nach EB-Färbung (gestrichelte Linie) und nach EB/MM-Färbung (durchgezogene Linie).

Die Ordinate $f(x)$ ist die sogenannte Wahrscheinlichkeitsdichte des jeweils besonderen Wertes (hier: CV-Wert), den die Variable x annimmt. Die Wahrscheinlichkeitsdichte hat ihr Maximum beim Mittelwert.

Nach dem U-Test bei Rangaufteilung nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (56) muß die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$ verworfen werden und die Alternativhypothese $\mu_1 < \mu_2$ auf dem 0,1 %-Niveau ($p < 0,001$) angenommen werden.

Graph der Dichte $f(x)$

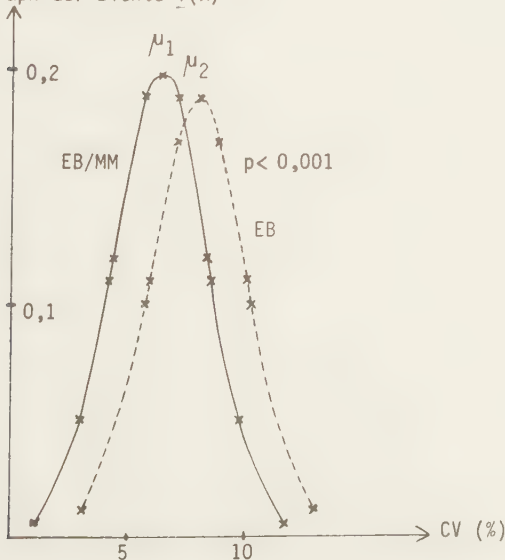


Abb. 15

Gauß'sche Verteilungskurven der Werte für die Fläche über Kanal 0-20 nach EB-Färbung (gestrichelte Linie) und nach EB/MM-Färbung (durchgezogene Linie).

Die Ordinate $f(x)$ ist die sogenannte Wahrscheinlichkeitsdichte des jeweils besonderen Wertes (hier: Wert für Flächengröße über Kanal 0-20), den die Variable x annimmt. Die Wahrscheinlichkeitsdichte hat ihr Maximum beim Mittelwert.

Nach dem U-Test bei Rangaufteilung nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (56) muß die Nullhypothese $\mu_1 = \mu_2$ verworfen werden und die Alternativhypothese $\mu_1 < \mu_2$ auf dem 0,5 %-Niveau ($p < 0,005$) angenommen werden.

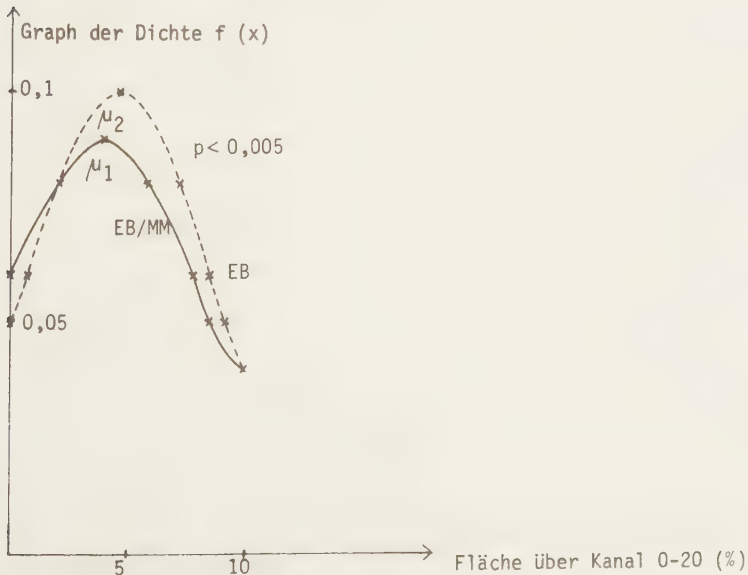
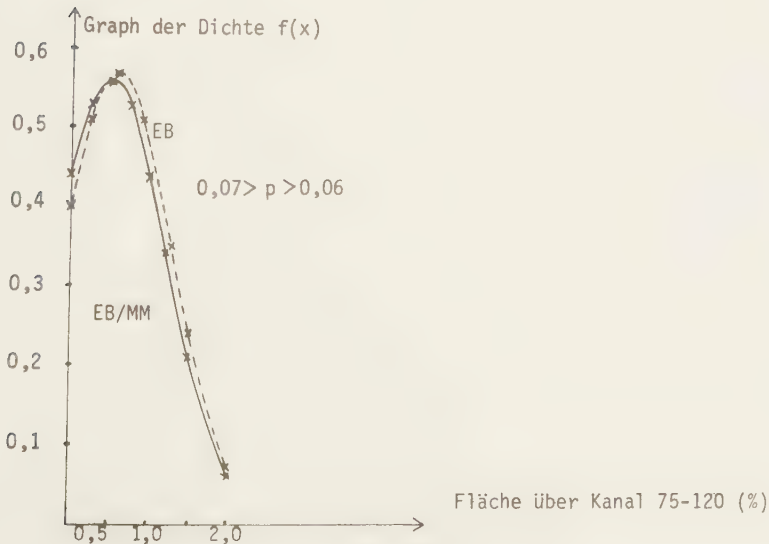


Abb. 16

Gauß'sche Verteilungskurven der Werte für die Fläche über Kanal 75-120 nach EB-Färbung (gestrichelte Linie) und nach EB/MM-Färbung (durchgezogene Linie).

Die Ordinate $f(x)$ ist die sogenannte Wahrscheinlichkeitsdichte des jeweils besonderen Wertes (hier: Wert für Flächengröße über Kanal 75-120), den die Variable x annimmt. Die Wahrscheinlichkeitsdichte hat ihr Maximum beim Mittelwert. Nach dem U-Test bei Rangaufteilung nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (56) muß die Nullhypothese $\mu = \mu_2$ bei einseitiger Fragestellung ($\alpha = 0,05$) beibehalten werden, da $0,07 > p > 0,06$ ist, d.h., der Unterschied der beiden Kurven ist nicht signifikant genug.



als 0,5% ($p < 0,005$) deutlich (Abb. 15). Eine Änderung in der Zahl der Zellverklebungen tritt nach EB/MM-Färbung nicht ein bzw. der Unterschied in der Flächengröße über Kanal 75-120, den die Abb. 16 suggeriert, muß auf dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bei einseitiger Fragestellung mit $0,07 > p > 0,06$ abgelehnt werden.

4. Diskussion

Die heute angestrebte gezielte Anwendung von Cytostatika bei der Therapie von Tumorerkrankungen bzw. Hämoblastosen setzt genaue Kenntnisse sowohl des Wirkungsmechanismus der Cytostatika als auch des Wachstumsverhaltens der zu behandelnden Tumor- bzw. leukämischen Zellen voraus (41). Eine große Zahl der gebräuchlichen teils cytostatisch, teils cytocid wirkenden Medikamente greift mit großer Intensität in den Zellstoffwechsel bestimmter Zellzyklusphasen ein (40,49).

Die unterschiedliche Phasenspezifität der einzelnen Cytostatika kann man grundsätzlich dadurch ausnutzen, daß man zunächst eine Anreicherung von Zellen der Tumorphasepopulation in einer Zyklusphase erhöhter Sensibilität anstrebt, um durch ein zweites Medikament mit entsprechender phasenspezifischer Cytotoxizität ein größeres Zellcompartment zu vernichten (19,67). Dabei läßt sich die Anreicherung sensibler Zellen durch die erste Komponente des Therapiemodells zum einen auf dem Wege einer Synchronisation nach Aufhebung (recovery) einer vollständigen Blockierung in einem engen Abschnitt des Zellzyklus erreichen. Wenn dann die synchronisierten Zellen die sensible Zyklusphase erreicht haben, folgt in einem optimalen Zeitabstand (timing) der zweite Therapieschritt (68). Eine andere Möglichkeit ist, durch eine

subtotale Arretierung oder Progressionsverzögerung in der sensiblen Phase selbst kontinuierlich therapiesensible Zellen anzureichern und ohne zwischengeschaltete Recovery-Zeit mit der zweiten Komponente anzugreifen. Schließlich kann auch eine Stimulation von Zellen des nichtproliferierenden Compartments (recruitment) zur Akkumulation beitragen (17,63).

Mehrere zellkinetische Therapieschemata für Tumoren und Leukämie wurden bereits klinisch angewandt. NITZE et al (51) (1972) benutzten s-Fluorouracil zur Blockierung im G_1/S -Bereich. Nach einer bestimmten Recovery-Zeit bestrahlten sie anschließend eine synchrone Zellfraktion in der strahlensensibleren G_2 -Phase. Dabei wurden ein verstärkter Bestrahlungseffekt und eine Zellsynchronisation nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden inzwischen u.a. mittels Impulscytophotometrie bestätigt (28,57,64). - KLEIN et al. (1972 + 1974) (42,43) gaben als erste Komponente Vincristin und erreichten eine Synchronisation aufgrund eines Mitoseblockes. Die Autoren nutzten dann die S-phasenspezifische Cytotoxizität von Cyclophosphamid, nachdem das synchronisierte Compartment die G_1 -Phase durchlaufen hatte. - BÜCHNER u.a. (1,9,10,14,15) wiesen eine Arretierung von Zellen in der S-Phase nach Gabe von Cytosin-Arabinosid bei mehreren Fällen von akuter myeloischer Leukämie nach.

Zur Kontrolle solcher Therapiemodelle eignet sich besonders die Impulscytophotometrie, indem sie den DNS-Gehalt als konstanten Parameter der Zelle der quantitativen Analyse zugänglich macht und in Form des DNS-Histogramms eine schnell verfügbare Compartmentverteilung in die verschiedenen Zellzyklusphasen G_1 (+ G_0), S und G_2 + Mitose liefert. Auf diese Weise lassen sich zellkinetische Effekte z.B. der Cytostathertherapie leicht erkennen und verfolgen.

Deshalb wurden an der Medizinischen Klinik der Universität Münster bei allen Patienten, bei denen zur Diagnostik oder zur Therapiekontrolle eine Knochenmarkpunktion notwendig wurde, u.a. auch impulscytophotometrische Messungen von Blut- und Knochenmarkzellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die bisher verwandte Präparationsmethode (16+33) im Hinblick auf eine klinisch verwertbare Kontrolle zellkinetischer Effekte verbesserungsfähig war. Vor allem die relativ große statistische Streuung als Folge einer unvollständigen Anfärbung der Zellen bzw. einer ungenügenden DNS- Spezifität der Färbung, aber auch die Anzahl der Zellfragmente und Zellverklebungen ließen eine Überprüfung der bislang routinemäßig durchgeführten Präparationsmethode (16+33) notwendig erscheinen. Zu diesem Zweck ist die Kenntnis der Farbstoffe und ihrer Wirkungsweise unabdingbare Voraussetzung.

Es gibt drei Gruppen von Reagenzien, die zur Fluoreszenzfärbung von zellulärer DNA benutzt werden (21):

1. Intercalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid und Propidiumiodid.
2. Die Feulgen - Farbstoffe Acriflavin und Flavophosphin N.
3. Auch cytostatisch wirkende Antibiotica wie Mithramycin, Olivomycin und Chromomycin A₃.

Diese Farbstoffe kann man weiter in zwei Klassen unterteilen (5,53):

1. Farbstoffe, die über eine physikalische Adsorption bzw. elektrostatische Interaktion wirken wie z.B. die o.g. intercalierenden Substanzen EB und PI.
2. Farbstoffe, die eine feste chemische Bindung zu einem unlösbaren Produkt eingehen. Dazu gehören die o.g. Feulgen-Farbstoffe und Antibiotica.

Bei der hier vorgelegten methodischen Studie wurde folgendermaßen vorgegangen:

Es wurde von den allgemein bekannten Präparationsmethoden (4,16,21,22,25,33,48,53,60) die bis dato in der hämatologischen Abteilung der Medizinischen Klinik der WWU Münster routinemäßig durchgeführte Präparationsmethode von BÜCHNER et al (16+33) mit dem Farbstoff Ethidiumbromid sowohl als Basismethode als auch als Vergleichsmaßstab genommen. Durch Verbesserung der einzelnen Präparationsschritte wurde versucht, die Streubreite der Zellen, die Zahl der Zellfragmente und Zellverklebungen zu verringern.

Demnach galt logischerweise als erster Schritt der chrono-

logischen Reihenfolge gemäß unsere Aufmerksamkeit der Hämolyse. Es ließ sich jedoch durch Hämolyse mit hypotoner Kochsalzlösung keine Verbesserung gegenüber der Hämolyse mit Leitungswasser erreichen. Im Gegenteil, im Einklang mit der Interpretation bisher veröffentlichter DNS-Histogramme (32,55) kann der Gipfel links vom Kanal 30 ($\hat{=}$ 2c) als unerwünschte Vermehrung von Zellfragmenten, die kleine Fluoreszenzsignale auslösen, gedeutet werden oder, was wahrscheinlicher ist, als unvollständige Anfärbung der Zellen mit Ethidiumbromid. Für diese Hypothese spricht auch die gleichzeitige Verbreiterung des G_1 -Gipfels nach Hämolyse mit hypotoner Kochsalzlösung.

In der 2. Versuchsreihe verbanden wir Hämolyse und Färbung zu einem Schritt, indem wir das zu untersuchende Knochenmark in nativem Zustand in hypotoner Ethidiumbromidlösung suspendierten. Dies geschah in Anlehnung an eine von KRISHAN 1975 (45) beschriebenen Methode, der unfixierte Zellen mit Propidiumiodid in hypotoner Zitratlösung färbte. Absicht war, zum einen den Einfluß des zur Fixation üblicherweise benötigten Äthanol auf die Impulshöhe der Fluoreszenzsignale auszuschalten (16), zum anderen durch Verringerung der Präparationsschritte die Zellverklebungen zu reduzieren und damit durch Nativfärbung die Farbstoffbindung der Zellen zu erhöhen. Es zeigte sich jedoch in 5 von 7 Fällen ein deutlicher

Anstieg der Fläche unter der Kurve links vom G_1 -Gipfel. Dies wurde als ungenügende Anfärbung der Zellen interpretiert. In der Zahl der Zellverklebungen, die sich im Histogramm rechts vom Gipfel über Kanal 60 ($\hat{=} 4c$) darstellen, ergab sich keine wesentliche Veränderung. Als Maßstab für die Spezifität der Farblösung wählten wir den CV (coefficient of variation) ¹⁾ (48). Dieser hängt außer von der Präparationsmethode von zwei weiteren Faktoren ab:

1. Von der biologischen Abweichung der DNA
2. vom dem Fehler der optischen und elektronischen Apparatur, einschließlich des statistischen Fehlers.

Der Einfluß dieser beiden Faktoren auf den CV wird jedoch für ziemlich gering gehalten. In diesem Falle wurde in über 50% der Fälle eine Vergrößerung des CV, d.h. eine geringere Genauigkeit des Histogramms erhalten.

Nach diesen beiden Versuchen erschien uns eine Verbesserung der Hämolysetechnik als wenig erfolgversprechend, so daß wir uns jetzt der Optimierung der Zellfärbung zuwandten. Wir untersuchten zunächst den Einfluß der Färbezeit mit EB auf die Qualität der DNA-Histogramme. Es stellte sich heraus, daß bei EB die Verlängerung der Färbezeit über 30 Minuten hinaus bis über 24 Stunden keine signifikante Veränderung der CV-Werte, der Zellfragment- und Zellverklebungszahl bewirkt (Abb. 9).

1) $CV = \frac{B \cdot 100}{a \cdot 2,35}$

B = Halbwertsbreite des G_1 -Gipfels
a = Kanal unter dem G_1 -Gipfel

Ferner verglichen wir die beiden häufig in der Literatur (3,4,5,16,33,59,70) angegebenen Standardlösungen für EB: 10 mg EB/l 0,9% NaCl und 10 mg EB/l Tris-Puffer bei pH 7,5. Wie aus den Abb. 10 ersichtlich, zeigte sich nach EB in Tris-Puffer eine deutliche Verschlechterung der Anfärbung der Zellen wie auch des CV, so daß wir für die folgenden Versuche weiter EB/0,9% NaCl verwandten. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß ZANTE (70) bei der Pronase-Testung mit EB in Tris-Puffer ein unspezifisches Absinken der Fluoreszenzsignale nach 10-minütiger Färbung feststellte, was schließlich zu unbrauchbaren Histogrammen führte. Diese Effekte waren bei EB in 0,9%-iger NaCl nicht wahrzunehmen.

Färbungen mit Feulgen-Reaktion sind genau, DNA-spezifisch und zeigen die gleichen DNA-Verteilungen wie nach Färbung mit EB oder PI. Die Ergebnisse sind jedoch von der Struktur des Kernchromatin abhängig, weshalb jeder Zelltypus einer unterschiedlich langen Hydrolyse bedarf (7). Die in der Literatur angegebenen Methoden benötigen zuviel Zeit (21,53), so daß wir auf der Suche nach einem schnellen, routinemäßig anwendbaren Verfahren diese Farbstoffe nicht mit untersuchten.

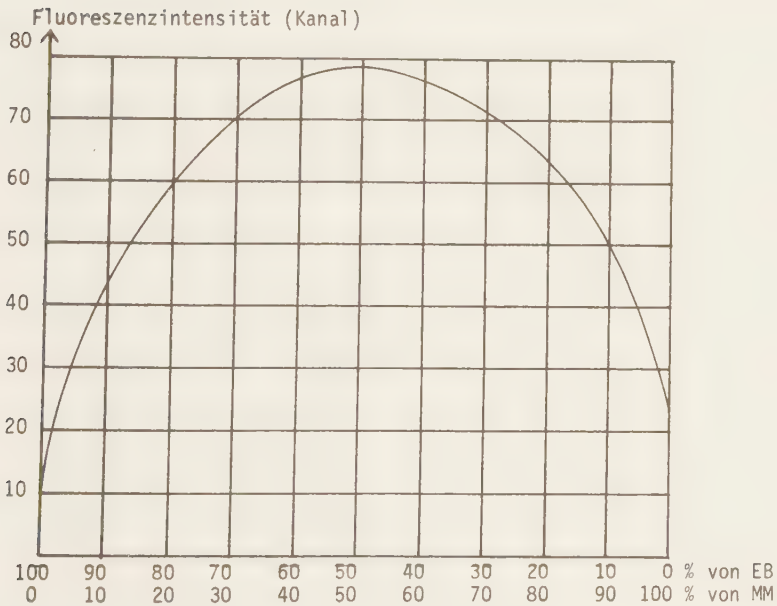
So verglichen wir als nächstes Mithramycin mit EB. Das Antibioticum Mithramycin (MM) bildet stabile Komplexe mit der DNA, obwohl anscheinend keine kovalente Bindung entsteht (65).

Es hat eine hohe Spezifität für die DNA-Helix, jedoch nicht für die RNA. Nukleinsäuren-Hydrolyse und RNase-Behandlung sind daher nicht erforderlich. MM scheint bei der Komplexbildung eine Affinität zur 2-Amino-Gruppe der Base Guanin zu haben, die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen, in unserem Fall Mg^{++} , ist erforderlich (39). Die DNA-Helix rollt sich dabei anscheinend nicht auf in der Annahme, daß MM nicht zu den intercalierenden Substanzen gehört (66) im Gegensatz zu EB, dessen Reaktionsweise ausführlich bei 2.3.1. beschrieben wurde. Ähnlich wie BARLOGIE (3) fanden wir bei diesen Versuchen keine Überlegenheit der finanziell kostspieligeren MM-Färbung gegenüber EB (Abb. 12), obwohl die Fluoreszenzimpulse ca. $1\frac{1}{2}$ x höher waren.

Einem Vorschlag von J. ZANTE und J. SCHUMANN folgend (69) testeten wir im folgenden eine Zweifarbstoff-Färbetechnik mit EB und MM. ZANTE (70) hatte mit einer äquimolaren Mischung dieser beiden Farbstoffe bei Ehrlich-Ascites-Tumor (EAT)-Zellen die größte Fluoreszenzzunahme und mit einer EB:MM-Mischung von 1:4 den geringsten CV erzielt (Abb. 17). Dabei wurde eine Verstärkung der Fluoreszenz um den Faktor 7,8 gegenüber alleiniger EB-Färbung und um den Faktor 3,4 gegenüber MM-Färbung errechnet. Für unsere Vergleichsmessungen mit EB/0,9%-iger NaCl wählten wir eine EB:MM-Mischung von 1:2 aus der theoretischen Überlegung heraus, das beste Ergebnis

Abb. 17

Rel. Fluoreszenzintensitäten von EHRLICH-ASZITES-Tumor-
zellen gefärbt mit Ethidiumbromid (EB) links ,
Mithramycin (MM) rechts und mit Mischungen von beiden
o.g. Farblösungen (ZANTE 1976)



aus einem bestmöglichen Kompromiß zwischen maximaler Fluoreszenz und minimalem CV zu erreichen. De facto konstatierten wir nach EB/MM-Färbung ein Ansteigen der Fluoreszenzlichtimpulse um ein Mehrfaches, mit dem jedoch nicht immer ein verbesserter CV korrelierte. Diese Inkonstanz erklärten wir uns durch eine noch nicht ausreichende Anfärbung der Zellen mit den beiden Farbstoffen. Darin sahen wir auch den Grund für den ausgeprägten Flächenanteil vor dem G_1 -Peak. Folgerichtig versuchten wir es nun mit einer zeitlich abgestuften EB:MM-Mischung im molaren Verhältnis von 1:2. Wir sahen uns in unserer Vermutung dadurch bestätigt, daß der "breite Fuß" des G_1 -Gipfels nach 30-minütiger EB-Färbung und darauf folgender 30-minütiger MM-Färbung nach längeren Einzelfärbezeiten verschwand und in allen Punkten verbesserte Histogramme gegenüber alleiniger EB-Färbung erzielt wurden. D.h. die Zellen werden besser gefärbt. Dies findet seinen Ausdruck in der Abnahme der Kurvenfläche über Kanal 0-20, des CV und der Zellverklebungsrates sowie in der Zunahme der Fluoreszenzimpulshöhe um ein Mehrfaches. Voraussetzung ist jedoch eine Mindesteinzelfärbezeit von einer Stunde. Eine zeitliche Begrenzung nach oben war nicht erforderlich, weil ein Einfluß auf die Histogramme nicht erkennbar war, von einer gelegentlich geringen Zunahme der Zellverklebungen abgesehen.

Dies Ergebnis versuchten wir nun in der letzten Versuchsreihe auch statistisch zu verifizieren, wobei wir die Zellen zuerst mindestens eine Stunde lang mit EB und darauf wiederum mindestens eine Stunde lang mit MM färbten, und zwar in einem molaren EB:MM-Verhältnis von 1:2. In der Tat wurden in allen Parametern verbesserte Ergebnisse erzielt, wie aus den Abb. 14,15,16 leicht ersichtlich ist. Dabei muß man jedoch erwähnen, daß die in der Abb. 16 zutage tretende Abnahme der Zellverklebungsrates nach EB/MM-Färbung den routinemäßigen statistischen Signifikanzansprüchen nicht genügt und damit eine Verbesserung dieses Parameters nach EB/MM-Färbung abgelehnt werden muß. Warum nun die Auflösung der Histogramme nach EB/MM-Färbung höher ist, ob mehr Bindungsplätze frei werden oder ob eine veränderte Energieübertragung im Spiele ist, bleibt z.Zt. noch unklar und der weiteren wissenschaftlichen Erforschung offen.

Zum Schluß noch ein Wort zur Anwendung von Enzymen, die oft in der Literatur empfohlen wird, um RNA- und andere extranucleäre Komponenten der Fluoreszenz auszuschalten. Wir verwandten in der vorliegenden Untersuchung aus folgenden Gründen keine Enzyme:

1. RNase wurde deshalb nicht angewandt, weil zum einen MM DNA-spezifisch ist und nicht signifikant mit RNA interagiert (20). Zum anderen stellten BÜCHNER,

HIDDEMANN et al. (16) und R.M. HIDDEMANN (33) bei der Anwendung von RNase bei Sternalpunktaten keinen wesentlichen Einfluß auf das Histogramm fest. Erwähnenswert wäre in diesem Zusammenhang noch, daß DARZYNKIEWICZ (24) eine langsame, zunehmende Denaturation von RNA in einem ionenarmen Medium bei Raumtemperatur nachgewiesen hat, insbesondere einen rapiden Abfall von doppelsträngiger RNA in den ersten Minuten. Die Anfärbbarkeit von einsträngiger RNA mit EB hingegen ist stark limitiert.

2. Die in der Literatur zur Beseitigung der Zytoplasma-Eigenfluoreszenz angegebenen (4,36) Enzyme wie Pronase, Trypsin und Pepsin wurden deshalb nicht verwandt, weil einerseits nicht ausgeschlossen werden kann, daß sie sich auf die Anfärbung von DNA in unterschiedlichen Zuständen - z.B. Euchromatin und Heterochromatin - unterschiedlich auswirken (16), andererseits auch Alterationen bzw. Zerstörungen von Zellen durch enzymatische Behandlung beschrieben worden sind (59).
3. Nicht zuletzt wurde auch im Hinblick auf die Entwicklung einer ökonomischen und routinemäßig leicht anwendbaren Präparationsmethode die nicht ganz auszuschließende, aber prozentual doch geringe extranucleäre Fluoreszenz (54) in Kauf genommen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der hier vorgelegten methodischen Studie war, eine ökonomische, der klinischen Routine und vor allem eine der hohen Leistungsfähigkeit des Impulscytophotometers gerechte Präparationsmethode zu entwickeln. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Es wurde die von BÜCHNER et al. (16) und von R.M. HIDDEMANN (33) beschriebene Präparationsmethode von Knochenmark und Blut als Basismethode wie auch als Vergleichsmaßstab gewählt und versucht, durch Verbesserung der einzelnen Präparations-schritte dem o.g. Ziel näherzukommen. Variiert wurden zum einen die Hämolyse-, zum anderen die Färbetechnik. Als Versuchsmaterial wurde einmal menschliches Blut, sonst durchweg menschliches Knochenmark verwendet.

Die modifizierte Präparationsmethode wurde anhand der mittels ICP gewonnenen DNS-Histogramme auf Qualität der Zellanfärbung, Ausmaß der Zellverklebungen und Entstehung von Zellfragmenten geprüft.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen können folgende Aussagen gemacht werden:

DNS-Histogramme von Blut nach Hämolyse mit hypotoner, d.h. 0,1%-iger Kochsalzlösung lassen gegenüber Histogrammen von Knochenmark nach Hämolyse mit Leitungswasser eine schlechtere

Anfärbbarkeit der Zellen erkennen.

Gleichzeitige Hämolyse und Färbung von Knochenmark mit hypotoner Ethidiumbromidlösung (10 mg EB/l 0,22% NaCl) offenbart im DNS-Histogramm in 71,4% der Fälle eine Verschlechterung der Zellanfärbung gegenüber Hämolyse mit Leitungswasser und konsekutiver Färbung mit EB (10 mg/l 0,9% NaCl) und zu 50% einen Anstieg der Zellverklebungsrate.

Durch Verlängerung der Färbezeit mit EB (10 mg/l 0,9% NaCl) bis zu 25,5 Stunden verändert sich das DNS-Histogramm von Knochenmark nicht wesentlich.

Eine nicht ausreichende Zellfärbung wird im DNS-Histogramm von Knochenmark deutlich bei Verwendung von Tris-Puffer anstatt von Kochsalz als Grundlösung für EB.

Färbung des Knochenmarks mit Mithramycin (MM) ergibt im DNS-Histogramm einerseits eine geringe Verschlechterung in Bezug auf die Anfärbbarkeit der Zellen, andererseits eine Zunahme der Fluoreszenzsignale um 37,5% bis 50%. Die Anzahl der Zellverklebungen bleibt konstant.

Die Fluoreszenz nach Färbung mit einer Mischung von EB und MM im molaren Verhältnis 1:2 nimmt um mindestens 147% gegenüber alleiniger EB-Färbung zu. Die Qualität der Zellanfärbung ist inkonstant, d.h. teils verbessert, teils verschlechtert.

Nach Färbung des Knochenmarks mit EB und darauffolgender Färbung mit MM erhöhen sich die Fluoreszenzsignale um bis zu

500% gegenüber singulärer EB-Färbung. Nach Färbezeiten von weniger als einer Stunde mit EB oder MM werden im DNS-Histogramm bei der EB/MM-Färbung Zeichen der ungenügenden Zellanfärbung sichtbar. Diese verschwinden nach Mindest-Einzelfärbezeiten von einer Stunde mit EB und darauf mit MM. Die Fläche über Kanal 0-20 verringert sich um durchschnittlich 0,5%. Dadurch wird in 70,8% der Fälle eine verbesserte Anfärbbarkeit der Zellen erreicht. Die Verringerung der Zellverklebungsrates ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,07 > p > 0,06$ nicht signifikant.

Abschließend kann gesagt werden, daß mit dieser Färbemethode nach vorheriger Hämolyse des Knochenmarks durch Leitungswasser und Konservierung in 35%-igem Alkohol eine einfach zu handhabende Präparationstechnik für hämatologisches Material für die ICP zur Verfügung steht, die statistisch reproduzierbare genaue Ergebnisse nach 2 Stunden Färbezeit liefert. Damit sind die Voraussetzungen für eine klinisch relevante und direkt verwertbare Kontrolle zellkinetischer Effekte gegeben.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Barlogie, B., Büchner, Th., Asseburg, U. und Kamanabroo, D.: Zellkinetischer Effekt von Cytosin-Arabinosid im klinischen Test. Med. Welt 25, 1532 (1974)
- 2 Barlogie, B., Drewinko, B., Büchner, Th., Göhde, W., Schumann, J., Hauss, W.H. und Freireich, E.J.: Pulse cytophotometry - A study on synchronized cells in vitro. Submitted to Cancer Res.
- 3 Barlogie, B., Zante, J., Drewinko, B., Schumann, J., Büchner, Th., Göhde, W., Hart, J.S. and Johnston, D.A.: The use of Mithramycin in Pulse - Cytophotometry (PCP). In 2nd international symposion, Pulse-Cytophotometry, 1976, pp. 125
- 4 Berkhan, E.: DNS-Messung von Zellen aus Vaginalabstrichen. Ärztl. Lab. 18, 77 (1972)
- 5 Berkhan, E.: The optimum concentration of dyes for fluorescent staining. Pers. Mitteilung 1973

- 6 Berkhan, E.: Digitale Ausgabe und Auswertung der Meßergebnisse des Impulscytophotometers. In: Impulscytophotometrie, Hrsg. M. Dandreeff, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975, pp. 50
- 7 Berkhan, E.: Pulse-cytophotometry as a method for rapid photometric analysis of cells. In first international symposium ed. C.A.M. Haanen, H.F.P. Hillen, J.M.C. Wessels, European Press Medikon, Ghent 1975, pp.15
- 8 Büchner, Th.: Impulscytophotometrie in der Hämatologie. Blut 28, 1 (1974)
- 9 Büchner, Th., Asseburg, U., Kamanabroo, D., Hiddemann, W. u. R., Barlogie, B. und Göhde, W.: Klinische Untersuchungen zur kombinierten Chemotherapie der Leukämie mit Teilsynchronisation der Zellen. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 80, 1674 (1974)
- 10 Büchner, Th., Barlogie, B., Asseburg, U., Hiddemann, W., Kamanabroo, D. und Göhde, W.: Accumulation of S-phase-cells in the bone marrow of patients with acute leukemia by cytosine-arabinoside. Blut 28, 299 (1974)



- 11 Büchner, Th., Dittrich, W. und Göhde, W.: Impulscytophotometrie von Blut- und Knochenmarkzellen. Verh.Dtsch. Ges.Inn.Med. 77, 416 (1971)
- 12 Büchner, Th., Dittrich, W. und Göhde, W.: Die Impulscytophotometrie in der hämatologischen Cytologie. Klin.Wschr. 49, 1090 (1971)
- 13 Büchner, Th., Dittrich, W. und Göhde, W.: Automatische DNS-Messungen zur Zellkinetik von Leukämien mit Hilfe der Impulscytophotometrie. In: Leukämie, Hrsg. R. Gross und J. van de Loo, Springer-Verlag 1972, pp. 205
- 14 Büchner, Th., Göhde, W., Dittrich, W. und Barlogie, B.: Proliferationskinetik von Leukämien vor und unter Therapie anhand der Impulscytophotometrie. Verh.Dtsch.Ges. Inn.Med. 78, 159 (1972)
- 15 Büchner, Th., Göhde, W., Schneider, R., Hiddemann, W. und Kamanabroo, D.: Zellsynchronisation und cytocide Effekte durch Chemotherapie der Leukämie in der Klinik anhand der Impulscytophotometrie. In: Impulscytophotometrie, Hrsg. M. Andreeff, Springer-Verlag 1975, pp. 77



- 16 Büchner, Th., Hiddemann, W., Schneider, R. und Kamanabroo, D.: Zur Präparation von Blut- und Knochenmarkzellen für die Impulscytophotometrie. Blut 28, 191 (1974)
- 17 Burke, P.J. and Owens Jr., A.H.: Attempted recruitment of leukemic myeloblasts to proliferative activity by sequential drug treatment. Cancer 28, 830 (1971)
- 18 Caspersson, T., Lomakka, G. and Svensson, G.: A coordinated set of instruments for optical quantitative high resolution cytochemistry. Exp.Cell Res. 4, 9 (1957)
- 19 Crawthorn, A.R., Roberts, J.J.: Mechanism of the cytotoxic action of alkylating agents in mamalian cells and evidence for the removal of alkylated groups from desoxyribonucleic acid. Nature 211, 150 (1960)
- 20 Crissmann, H.A., Steinkamp, J.A.: Preparative methods for analysis of DNA, Protein and nuclear-to-cytoplasmic ratios in normal and tumor cell populations. In first international symposion, Pulse-Cytophotometry, Hrsg. Hillen, H.F.P., Haanen, C.A.M. und Wessels, J.M.C., European Press Medikon, Ghent 1975, pp. 22

- 21 Crissmann, H.A., Steinkamp, J.A.: Comparison of quantitative fluorescent staining methods for flow-system analysis of DNA, Protein and nuclear-to-cytoplasmic size in cultured cells, tumor cells and human gynecological specimens. In 2nd international symposium, Pulse-Cytophotometry, Hrsg. Göhde, W., Schumann, J., Büchner, Th., European Press Medikon, Ghent 1976, pp. 112
- 22 Crissmann, H.A., Tobey, R.A.: Cell cycle analysis in 20 minutes. *Science* 188, 1297 (1974)
- 23 Crosland-Taylor, T.J.: A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* 171, 37 (1953)
- 24 Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Conformation of RNA in situ as studied by Acridine Orange staining and automated cytofluorometry. *Exp. Cell Research* 90, 411 (1975)
- 25 Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R.: Acridine Orange staining and automated cytofluorometry in Studies of conformational changes in nuclear chromatin. In first international symposium, Pulse-Cytophotometry, Hrsg. Hillen, H.F.P., Haanen, C.A.M., Wessels, J.M.C., European Press Medikon, Ghent 1975, pp.88



- 26 Dilla van, M.A., Trujillo, T.T., Mullaney, P.F., Coulter, J.R.: Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163, 1213 (1969)
- 27 Dittrich, W., Göhde, W.: Impulsfluorometrie von Einzelzellen in Suspension. *Zeitung für Naturforschung* 24b, 360 (1969)
- 28 Esser, E., Schumann, J., Wannenmacher, M.: Zur Strahlenbehandlung inoperabler orofacialer Plattenepithelkarzinome nach pharmakologisch induzierter Teilsynchronisation. *Dtsch.zahnärztl.Z.* 30, 222 (1975)
- 29 Göhde, W.: Automation in der quantitativen Zytologie mit dem Impulszytophotometer. Sonderdruck GBK, Mitteilungsdienst 6, 2, 255 (1972)
- 30 Göhde, W.: Zellzyklusanalysen mit dem Impulscytophotometer. Habilitationsschrift, Münster 1973
- 31 Göhde, W., Dittrich, W.: Impulsfluorometrie - ein neuartiges Durchflußverfahren zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhaltsstoffen. *Acta histochemica Supply* 10, 429 (1971)



- 32 Göhde, W., Dittrich, W., Zinser, H.K., Prieshof, J.:
Impulszytophotometrische Messungen an atypischen Zell-
abstrichen aus Scheide und Cervix uteri. Zeitschrift
für Geburtsh. u. Frauenheilk. 32, 389 (1972)
- 33 Hiddemann, R.M.: Untersuchungen zur Präparation von
Blut- und Knochenmarkzellen als Voraussetzung für die
Anwendung der Impulscytophotometrie im Rahmen der Zell-
kinetik bei Leukämien. Inaugural-Dissertation, Münster 1978
- 34 Howard, A., Pelc, S.R.: Synthesis of desoxyribonucleic
acid in normal and irradiated cells and its relation to
chromosome breakage. Heredity Suppl. 6, 261 (1953)
- 35 Kamensky, L.A., Melamed, M.R. and Dearmann, H.:
Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell
analysis. Science 150, 630 (1965)
- 36 Karsten, U. and Wollenberger, A.: Determination of DNA
and RNA in homogenized cells and tissues by surface
fluorometry. Anal. Biochem. 46, 135 (1972)
- 37 Kersten, W. and Kersten, H.: Anthracyclines. In: Inhi-
bitors of nucleic acid synthesis, Biophysical and Bio-
chemical aspects, Molecular Biology, Biochemistry and
Biophysics 18, Springer-Verlag 1974, pp. 67

- 38 Kersten, W. and Kersten, H.: Chromomycin, Olivomycin and Mithramycin. In: Inhibitors of nucleic acid synthesis, Biophysical and Biochemical aspects, Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 18, Springer-Verlag 1974, pp. 86
- 39 Kersten, W., Kersten, H. and Szybalski, W.: Physico-chemical properties of complexes between desoxyribo-nucleic acid and antibiotics which affect ribonucleic acid synthesis (Actinomycin, Daunomycin, cinerubin, Nogalamycin, Chromomycin, Mithramycin, Olivomycin). Biochemistry 5, 236 (1966)
- 40 Klein, H.O., Gross, R., Lennartz, K.J.: Untersuchungen zur Proliferationskinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen und ihre Bedeutung für die cytostatische Therapie. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 77, 738 (1971)
- 41 Klein, H.O., Lennartz, K.J.: Proliferationskinetische Grundlagen der Behandlung von akuten Leukosen. In: Leukämie, Hrsg. Gross, R., van de Loo, J., Springer-Verlag 1972, pp. 479
- 42 Klein, H.O., Lennartz, K.J.: Chemotherapy after synchronization of tumor cells. Sem. Hematol. 11, 203 (1974)

- 43 Klein, H.O., Lennartz, K.J., Gross, R., Eder, M.,
Fischer, R.: In vivo- und in vitro-Untersuchungen zur
Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen.
Ihre Bedeutung für die zytostatische Tumorthherapie.
Dtsch.med.Wschr. 97, 1273 (1972)
- 44 König, S.H., Brown, R.D., Kamentsky, L.A., Sedlis, A.
and Melamed, M.R.: Efficiency of a rapid cell spectrophoto-
meter in screening for cervical cancer. Cancer 21, 1019
(1968)
- 45 Krishan, A.: Rapid flow cytophotometric analysis of
mammalian cell cycle by Propidium Iodide staining.
J. Cell Biol. 66, 188 (1975)
- 46 Le Pecq, J.B. and Paoletti, C.: A new fluorometric method
for RNA and DNA determination. Analytical Biochemistry
17, 100 (1966)
- 47 Le Pecq, J.B. and Paoletti, C.: A fluorescent complex
between Ethidium Bromide and nucleic acids. J. Molec.Biol.
27, 87 (1967)

- 48 Linden, W.A., Baisch, H., Seibold, G.: Quantitative comparison of measurements with different fluoro-chromes of DNA. In 2nd international symposion, Pulse-Cytophotometry, 1976, pp. 107
- 49 Mauer, A.M., Lampkin, B.C., MacWilliams, N.B.: Effects of chemotherapeutic agents on cell cycle and cellular proliferation: basic and clinical considerations. Transplantation proceedings Vol. 5, 3, 1181 (1973)
- 50 Moldovan, A.: Scientific apparatus and laboratory methods. Photoelectric technic for the counting of microscopical cells. Science 80, 188 (1934)
- 51 Nitze, H.R., Ganzer, U., Vosteen, K.-H.: Die Strahlenbehandlung maligner Tumoren nach Synchronisation des Zellteilungsrythmus. Erfahrungen nach zweijähriger klinischer Anwendung. Strahlentherapie 143, 329 (1972)
- 52 Ploem, J.S.: The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie und mikroskopische Technik 68, 129 (1967)

- 53 Prenna, G., Mazzini, G., Bottiroli, G., Freitas, I.:
Automated determination of DNA cellular content (Feulgen)
improved by using BBT-SO₂ in flow cytofluorometry.
In 2nd international symposium, Pulse-Cytophotometry,
1976, pp. 88
- 54 Rauen, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, 2. Aufl.,
Springer-Verlag, 1964, pp. 336
- 55 Reiffenstuhl, G., Severin, E., Dittrich, W., Göhde, W.:
Die Impulscytophotometrie des Vaginal- und Cervicalsemears.
Arch. Gynäk. 211, 611 (1971)
- 56 Sachs, L.: Angewandte Statistik, 5. Aufl., Springer-Verlag,
1978, pp. 172, 235, 236
- 57 Schumann, J., Ehring, F., Göhde, W.: Cell synchronization
in solid tumors. In: Recent Results in Cancer Research,
ed. by E. Grundmann and R. Gross, Springer-Verlag, 1975
- 58 Severin, E.: Zum Problem der Selektivität von Ethidium-
bromid in der Cytofluorometrie cellulärer DNS. Vergleich-
ende cytophotometrische Untersuchungen an Leberzellen.
In: Impulscytophotometrie, Hrsg. M. Andreeff, Springer-
Verlag, 1975, pp. 20

- 59 Severin, E.: Comparative microfluorometric investigations by MPV and ICP on liver cells and synchronized tumor cells. In first international symposium, Pulse-Cytophotometry, 1975, pp. 42
- 60 Tobey, R.A., Crissmann, H.A., Kraemer, P.M.: A method for comparing effects of different synchronizing protocols on mammalian cell-cycle traverse. J. Cell. Biol. 54, 638 (1972)
- 61 Tribukait, B., Moberger, G., Zetterberg, A.: Methodological aspects of rapid-flow cytofluorometry for DNA analysis of human urinary bladder cells. In first international symposium, Pulse-Cytophotometry, 1975, pp. 50
- 62 Vendrely, C.: Cytophotometry and biochemistry of the cell cycle. In: The cell cycle and cancer. Editor: R. Baserga, Dekker New York, 1971, pp. 227
- 63 Vogler, W.R., Cooper, L.E., Groth, D.P.: Correlation of Cytosine-Arabinoside-induced increment in growth fraction of leukemic blast cells with clinical response. Cancer 33, 603 (1974)

- 64 Wannenmacher, M., Esser, E., Glupe, J., Schumann, J.:
Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Strahlen-
behandlung inoperabler Tumoren nach Teilsynchroni-
sation. Strahlentherapie 147, 1 (1974)
- 65 Ward, D.C., Reich, E. and Goldberg, I.H.: Base specificity
in the interaction of polynucleotides with antibiotic
drugs. Science 149, 1259 (1965)
- 66 Waring, M.: Variation of the supercoils in closed circular
DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for
molecular models involving intercalation. J. Mol. Biol.
54, 247 (1970)
- 67 Wheeler, G.P.: Some biochemical effects of alkylating
agents. Med. Proc. 26, 885 (1967)
- 68 Wilmanns, W., Wilms, K., Rajewsky, M.F.: Biochemische
Grundlagen der Behandlung von Leukosen. In: Leukämie
Editores: Gross, R., van de Loo, J., Springer-Verlag,
1972, pp. 472
- 69 Zante, J.: Persönliche Mitteilung, 1975

- 70 Zante, J., Schumann, J., Barlogie, B., Göhde, W.,
Büchner, Th.: New preparating and staining procedures
for specific and rapid analysis of DNA distributions.
In 2nd international symposion, Pulse-Cytophotometry,
1976, pp. 97

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Th. Büchner möchte ich für die Überlassung des Themas und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge während der Erstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Außerdem möchte ich meiner Mutter, Frau Lieselotte Fahrenkrog, für das Schreiben der Arbeit und Frau Nortrud Schneidt für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen herzlich danken.

8. Lebenslauf

Am 5.2.1953 wurde ich in Hamburg als Sohn des Personalleiters und Prokuristen Kurt Fahrenkrog und seiner Ehefrau Lieselotte Fahrenkrog, geb. Wittenberg, geboren. In Wuppertal besuchte ich von 1957 bis 1961 die Volksschule, anschließend das humanistische Wilhelm-Dörpfeld-Gymnasium. Das Abitur bestand ich am 13.5.1971.

Vom Wintersemester 1971 an studierte ich an der Ruhr-Universität Bochum Humanmedizin. Nach dem Physikum am 28.3.1974 wechselte ich an die WWU Münster. Dort bestand ich den 1. Teil des Staatsexamens am 25.3.1975, den 2. Teil am 31.3.1977.

Das praktische Jahr und den letzten Teil des Staatsexamens absolvierte ich an der Universitätsklinik Düsseldorf.

Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 30.5.1978.

Seit dem 1.7.1978 arbeite ich als Assistenzarzt im Ferdinand-Sauerbruch-Klinikum in Wuppertal-Elberfeld mit dem Ziel, Facharzt für Innere Medizin zu werden.

